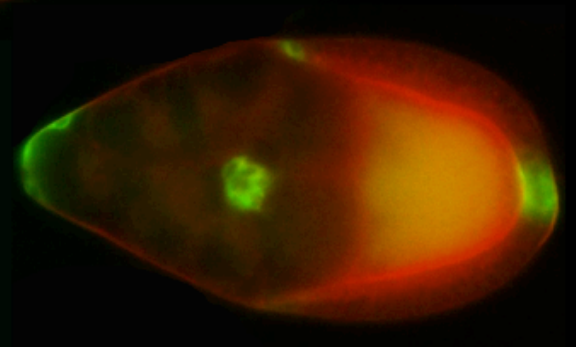
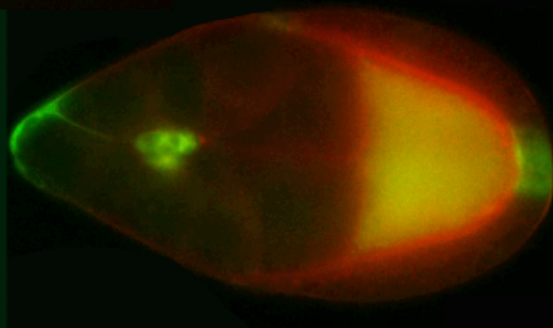
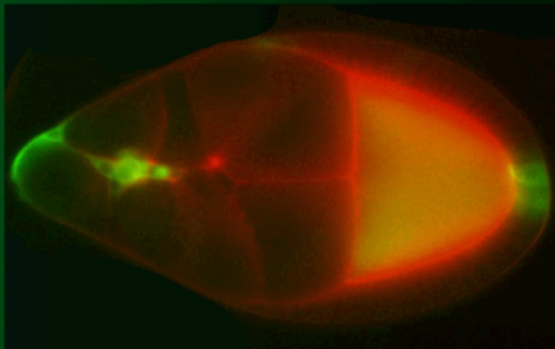


Mecanismos moleculares que regulan la migración celular colectiva.



Cecilia Huertas Fernández-Espartero



Mecanismos moleculares que regulan la migración celular colectiva.

Memoria de Tesis Doctoral presentada por Cecilia Huertas Fernández-Espartero para optar al grado de Doctor por la Universidad Pablo de Olavide.

Tutor

Directora

Dr. Manuel J. Muñoz Ruiz

Dra. María Dolores Martín Bermudo

Cecilia Huertas Fernández-Espartero

Centro Andaluz de Biología del Desarrollo. Departamento de
Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica. CSIC-Universidad
Pablo de Olavide-Junta de Andalucía, Sevilla

Sevilla, 2013



A mi madre

AGRADECIMIENTOS

Ante todo quiero dar las gracias a Lola, mi directora de tesis, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio. Me has enseñado muchísimo y me he sentido realmente apoyada en todos estos años.

Por supuesto a Acaimo, por sus muchos sabios consejos, y por su preocupación personal por todos nosotros. Y gracias por poner esos puntos de humor casi diarios en el laboratorio.

A Bea Estrada por su saber estar y por poner el punto de cordura necesaria en el laboratorio.

A mis compis de laboratorio que me han ayudado siempre. A Fati y María Jesús. Hemos compartido muchos momentos buenos y malos y siempre habéis estado ahí, no se me olvidará nunca. Pepe, te meto en el mismo saco porque también he sentido siempre tu apoyo y tu saber estar (solo en ocasiones, ehh), he tenido muy buenos momentos contigo y me he reído mucho, tras pasar el trauma inicial debido a tus bromas bestias.

A Bea, Juanjo y Clara, por las risas y las miriendas. Juanjo! No somos nadie..... y tú menos! (jejeje). No te olvides de poner siempre 1 en 100 del 1 en 100. Clarita, gracias por tu apoyo y comprensión y por supuesto por tus enseñanzas del Western Blot.

A la Alicia, la Mari Carmen y la Alfon por su ayuda científica y nuestros despejes en las pocas horas que nos quedaban en el día tras nuestra intensa jornada de laboratorio. MC, verdá que es verdá que hemos tenido picueteceas varias de las que hemos salido airoosas, jejeeje. Gracias por esos momentos de risas que nos hemos pegado. Alicia, hemos pasado muchas cositas también y nos hemos apoyado mucho como casi hermanas que somos, gracias por las cancioncillas que de vez en cuando cantas de las cuales nadie conoce el autor. Alfon, a ver ese positivismoool, gracias por tus sonrisas mañaneras que contrastaban con mi seriedad.

Besaid, gracias por no mover la pierna de forma impulsiva cuando fuiste mi compañero de mesa, jejeje, es broma. Gracias por poner el puntito borriquillo, me he reído mucho y le has dado vida al laboratorio.

Gracias al resto de compis: Andrea, María, Inka y M^a José, ánimo con vuestros proyectos tanto profesionales como personales y gracias por ser buenas compañeras. María, cuida esa huerta. Y por supuesto gracias a los que ya se fueron: Laura, Marianne, Patri, Ivet y John.

A mis padres, sin los cuales no podría haber avanzado en la vida. Muchísimas gracias por haber creído siempre en mí. Papá, gracias por haber creído que era una especie de diosa científica, me halaga muchísimo, te prometo que intentaré ganar el premio Nobel, pero eso no es nada fácil tenlo en cuenta (jejeje). Mami, gracias por ser la mujer más fuerte que he conocido en mi vida y tirar para adelante con todo hasta el final, eres mi ejemplo a seguir. Os quiero mucho.

Y por supuesto, mil millones de gracias a David. Has tenido una paciencia infinita. Te ha tocado vivir conmigo los dos finales más duros,

la finalización de la carrera y de la tesis, dos buenos partos. Siempre he sentido tu apoyo, sobretodo en los momentos más duros de mi vida. ¡Te quiero guapetón!

INDICE

INTRODUCCIÓN	13
1. MIGRACIÓN CELULAR	15
1.1. Moléculas implicadas en la migración celular	17
1.1.1. Moléculas de adhesión celular: Cadherinas	17
1.1.2. Rho GTPasas y su papel en la migración celular	20
1.1.2.1. Regulación de las Rho GTPasas	23
1.1.3. Los factores GEFs	24
1.1.3.1. El GEF Vav en la migración	27
1.1.4 Receptores tirosina kinasas	30
2. LAS CÉLULAS DEL BORDE COMO SISTEMA MODELO PARA EL ESTUDIO DE LOS MECANISMOS QUE REGULAN LA MIGRACIÓN CELULAR	33
2.1. Especificación de las células del borde	34
2.2. Migración de las células de borde	35
2.3. Moléculas implicadas en la migración de las células del borde	37
2.3.1. La hormona Ecdisona	37
2.3.2. DE-cadherina	38
2.3.3. Las Rho GTPasas	40
2.3.4. RTKs	42
OBJETIVOS	47
RESULTADOS	51
1. BÚSQUEDA DE NUEVOS GENES CANDIDATOS IMPLICADOS EN LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS DEL BORDE.	53
1.1. Genes que interaccionan físicamente con EGFR/PVR	53
1.2. Estudio de los fenotipos de migración	57
1.2.1. Caracterización de los genes candidatos	62
1.2.1.1 Coracle	62

<ul style="list-style-type: none"> • Localización de la proteína Coracle, el homólogo de <i>Drosophila</i> de Protein 4.1, durante la migración de las BCs. 	63
<ul style="list-style-type: none"> • Caracterización del papel de Coracle durante la migración de las BCs 	64
1.2.1.2 CG2887	67
1.2.1.3 CG33993	68
1.2.1.4 Vav	70
2. EL GEF <i>vav</i> EN LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS DEL BORDE.	72
2.1 Caracterización del papel de Vav en las BCs	72
2.1.1 Vav se requiere para la migración de las BCs	72
2.1.2 Vav se localiza en las BCs antes y durante la migración	76
2.1.3 Vav se requiere para la formación y distribución de las proyecciones durante la migración de las BCs	77
2.1.4 Vav determina la velocidad de migración de las BCs	82
2.1.5 Vav actúa como GEF para Rac1 en las BCs	85
2.1.6 Vav regula la actividad de Rac1 en las BCs	88
2.2 Vav interacciona genéticamente con los receptores tyrosin kinases EGFR y PVR	90
2.3 Análisis de otros GEFs implicados en migración de BCs y su interacción con Vav	95
2.4 Interacción de la proteína Vav con otros activadores de Rac, el complejo Mbc /ELMO, en la migración de las BCs	96
DISCUSIÓN	99
1. Coracle	104
2. CG2887	107
3. CG33993	109
4. El papel de Vav en la migración celular	111
4.1 Mecanismos celulares por los cuales Vav regula la migración celular: dinámica de proyecciones	112
4.2 Vav se requiere para la activación de Rac1 durante la migración de las BCs	114

4.3 Vav actúa corriente abajo de los RTKs PVR y EGFR	115
4.3 Vav y otros GEFs	117
CONCLUSIONES	121
MATERIAL Y MÉTODOS	125
BIBLIOGRAFÍA	137

Índice de Figuras

Figura 1.- Esquema de los distintos tipos de migración celular	16
Figura 2.- Esquema de la activación de las Rho GTPasas mediada por las moléculas GEFs, GAPs y GDIs	24
Figura 3.- Esquema de los dominios conservados de la proteína Vav en tres especies: mamíferos, <i>Drosophila melanogaster</i> y <i>C. elegans</i>.	28
Figura 4.- Esquema del ovario de la hembra de <i>Drosophila melanogaster</i>.	36
Figura 5.- Dinámica de la migración de las BCs.	37
Figura 6.- Localización de la cadherina y actina durante la migración de las células del borde.	40
Figura 7.- Esquema de PA-RacQ61L fotoactivable.	42
Figura 8.- Fenotipo de migración de las formas dominantes negativas de PVR y EGFR.	44
Figura 9.- Expresión de cada gen candidato en tejidos adultos de <i>Drosophila</i> extraído de FlyBase.	57
Figura 10.- Patrón de expresión de las líneas Gal4.	58
Figura 11.- Esquema del criterio de cuantificación de los fenotipos de migración de las BCs.	59
Figura 12.- Análisis del fenotipo de los RNAs de los genes candidatos.	61
Figura 13.- Coracle se localiza en las PCs.	64
Figura 14.- Expresión de <i>coracle</i> en cámaras huevo que expresan <i>coraRNAi</i>.	64
Figura 15.- Expresión de la actina, cadherina y Discs large en BCs que expresan <i>coraRNAi</i>.	66
Figura 16.- Expresión de la actina, cadherina y Discs large en BCs que expresan <i>CG2887RNAi</i>.	68
Figura 17.- Expresión de la actina, cadherina y Discs large en BCs que expresan <i>CG33993RNAi</i>.	69
Figura 18.- Panel de la tinción de actina y DE-cadherina en BCs que expresan <i>vavRNAi</i>.	71
Figura 19.- Esquema de la generación de clones mediante el sistema FLP/FRT.	73
Figura 20.- Vav se requiere en la migración de las BCs.	75
Figura 21.- Localización de Vav en las BCs.	77
Figura 22.- Imagen <i>in vivo</i> de <i>vavRNAi</i> expresado en las BCs.	78
Figura 23.- Vav se requiere para la distribución de las proyecciones en el frente.	80

Figura 24.- Secuencia de imágenes del estudio <i>in vivo</i>.	81
Figura 25.- Esquema de la fase temprana donde las BCs adquieren morfología alargada y la fase tardía donde son más redondeadas.	82
Figura 26.- Estudio de la velocidad y distancia recorrida por las BCs.	84
Figura 27.- La expresión ectópica Vav bloquea la migración y produce acumulación de actina en las BCs.	86
Figura 28.- Expresión de Vav^{act}-HA.	87
Figura 29.- Análisis <i>in vivo</i> de la expresión de la forma constitutivamente activa de <i>vav</i>.	88
Figura 30.-Esquema del sistema FRET.	89
Figura 31.- Análisis de la activación de Rac1 mediante FRET.	90
Figura 32.- Vav interacciona genéticamente con PVR y EGFR.	92
Figura 33.- Interacción genética entre <i>vav</i> y los dos RTKs, PVR y EGFR.	93
Figura 34.- Modelo	94
Figura 35.- Cuantificación de los fenotipos de migración correspondientes con la expresión de lo RNA interferentes de <i>vav</i>, <i>trio</i> y <i>sos</i>.	96
Figura 36.- Interacción genética entre <i>vav</i> y <i>mbc/elmo</i>.	98
Figura 37.- Diferentes proteínas con dominio SH2.	110
Figura 38.- Modelos de la hipótesis.	119
Figura 39.- Esquema de los sistemas utilizados para los estudios de falta de función.	129
Figura 40.- Esquema de disección de ovarios para estudios <i>in vivo</i>.	132
Figura 41.- Esquema de medición de proyecciones.	134
Tabla1- Tabla de GEFs reguladores de la superfamilia Ras modificada de Bos et al., 2007.	25
Tabla 2.- Características de genes candidatos.	54

Introducción

1. MIGRACIÓN CELULAR

La migración celular es un proceso fundamental tanto durante el desarrollo embrionario como a lo largo de la vida del organismo. En organismos adultos, tiene gran importancia en los procesos homeostáticos tales como la respuesta inmune y la reparación de tejidos. La migración celular también puede contribuir a algunos procesos patológicos, incluyendo enfermedades vasculares, enfermedades inflamatorias crónicas y procesos metastáticos (Friedl et al., 2004).

Durante el desarrollo, existen dos modos principales de movimiento celular, la migración individual y la migración colectiva. Las células que migran de forma individual son células procedentes de epitelios que mediante una transición epitelio-mesénquima (EMT), en el que tiene lugar cambios en la polaridad y adhesión celular, se delaminan y se convierten en células mesenquimales con capacidad de migrar. Este proceso no es irreversible, por lo que la célula mesenquimal puede volver a adquirir propiedades epiteliales y formar parte nuevamente de un epitelio en una transición mesénquima-epitelio (MET). En la migración colectiva no se considera que el proceso por el cual se inicia la migración sea a través de una EMT propiamente dicha. Ello se debe a que la migración colectiva se entiende como el movimiento de varias células, bien formando parte de un grupo, de una fila o de una capa, que mantienen características similares a las células epiteliales (Fig.1). En estos grupos o capas celulares las células permanecen funcional y físicamente conectadas, de manera que la unión entre células se conserva durante el movimiento lo que permite mantener la integridad del grupo. Un ejemplo de migración colectiva en capas es el proceso de gastrulación durante el desarrollo embrionario, donde capas de células migran de forma colectiva para formar las tres láminas embrionarias. Una vez formadas estas láminas, las células se diferencian y en algunos casos siguen migrando de forma colectiva hasta los lugares diana donde formarán los tejidos y órganos. Otro ejemplo de migración colectiva durante el desarrollo, es el cierre dorsal en el embrión de *Drosophila*. La migración colectiva en grupos, también se ha observado en cultivos de

células cancerígenas (Kolega, 1981; Easty and Easty, 1974). En este caso, existen dos variantes de la migración colectiva. En la primera variante, el núcleo del tumor se mantiene en el lugar de origen y emite extensiones de grupos celulares que mantienen el contacto con el núcleo del tumor. Esto se ha observado en cultivos celulares tumorales de colon, mama y melanomas. En el segundo tipo de migración colectiva de células cancerígenas, un grupo de células se delamina del tumor y migra una distancia mayor que en el caso anterior invadiendo nuevas zonas (revisado en Friedl et al., 2004).

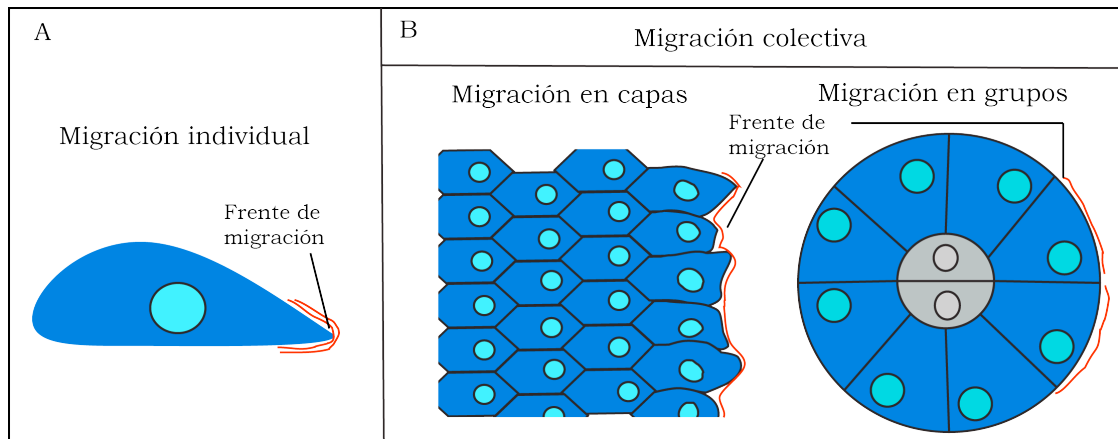


Figura 1.- Esquema de los distintos tipos de migración celular.

En general, la migración celular se considera un proceso cíclico. Este ciclo comienza con la adquisición de una polaridad celular, de tal manera que se genera una asimetría espacial entre la parte frontal y la trasera de la célula. Esta polarización es debida a la recepción de señales externas, estímulos quimiotácticos, factores de decrecimiento o proteínas de la matriz extracelular, las cuales determinan la dirección de la migración. Una consecuencia de la polarización es la formación de prolongaciones transitorias de la membrana celular en el frente de migración. Estas prolongaciones o extensiones, conocidas como filopodios y lamelipodios, son responsables del movimiento celular. Una importante molécula implicada en la formación de estas extensiones es la actina, un componente del citoesqueleto celular. La polimerización de actina es necesaria para la formación de lamelipodios y filopodios y está regulada tanto por proteínas que controlan la disponibilidad de monómeros de actina como por proteínas que depolimerizan actina. Una

vez formados los lamelipodios y filopodios, estos necesitan anclarse al sustrato sobre el que migra la célula, que puede ser o bien la matriz extracelular o bien otras células adyacentes. Los puntos de adhesión de los lamelipodios y filopodios se conocen como adhesiones focales. Estos deben ser dinámicos de tal modo que, si bien se establecen en el frente de migración, se deben desestabilizar en la parte lateral y trasera de la célula para permitir el movimiento celular. La desestabilización en la parte trasera de la célula produce la retracción y contracción del cuerpo celular, lo que induce la migración.

1.1. Moléculas implicadas en la migración celular

1.1.1. Moléculas de adhesión celular: Cadherinas

Entre las proteínas implicadas en la formación de adhesiones celulares cabe destacar los miembros pertenecientes a la superfamilia de las cadherinas (Yagi and Takeichi, 2000; Nollet et al., 2000). Existen al menos 80 miembros de esta superfamilia descritos en mamíferos, entre los que se encuentran las cadherinas clásicas, Fat cadherina y “seven-transmembrane cadherin” (Gumbiner, 2000; Tepass et al., 2000; Hirano et al., 2003). Estas subfamilias se encuentran conservadas entre vertebrados e invertebrados. Todas las cadherinas, con alguna excepción, son proteínas transmembrana que se caracterizan por poseer un único dominio llamado EC, implicado en las uniones celulares dependientes de Ca^{2+} (Takeichi, 1990). Este dominio está compuesto por repeticiones en tándem, que varían en número entre los miembros de la superfamilia, aunque la mayor divergencia entre los miembros se debe al dominio citoplasmático.

Las primeras cadherinas descritas fueron las pertenecientes a las cadherinas clásicas. Son bien conocidas por ser esenciales para la formación de uniones adherentes entre las células y el mantenimiento de tejidos epiteliales. Por este motivo y puesto que en este trabajo hablaremos de la migración colectiva de células epiteliales, en la cual se mantienen las adhesiones entre las células, nos centraremos en esta subfamilia.

Las cadherinas clásicas tienen un dominio extracelular que media la interacción entre células y un dominio citoplasmático, altamente conservado, implicado en la interacción con el citoesqueleto de actina (revisado en Shapiro and Weis, 2009). Esta interacción la realizan a través de las cateninas, proteínas citoplasmáticas adaptadoras, entre las que se encuentran las cateninas α , β y p120ctn. Concretamente las cadherinas se unen a la p120 y/o a la β -catenina, las cuales interaccionan con la α -catenina que a su vez media la interacción con las proteínas del citoesqueleto (revisado en Halbleib and Nelson, 2006).

Las cadherinas clásicas tienen un amplio espectro de función y de expresión. Así, están implicadas tanto en adhesión celular como en reconocimiento celular, coordinación de movimientos celulares, y formación y mantenimiento de tejidos. Al encontrarse en numerosos tejidos o tipos celulares, la clasificación de algunas cadherinas clásicas se ha establecido en función del tejido donde se expresan de forma mayoritaria, así encontramos la cadherina epitelial (E-cadherina), la neural (N-cadherina), la renal (R-cadherina), la vascular (V-cadherina) y la vasculo-endotelial (VE-cadherina) entre otras (revisado en Gumbiner, 2005). Uno de los procesos más importantes en el que participan los miembros de esta subfamilia es la EMT. En células epiteliales la E-cadherina se requiere para el mantenimiento de las uniones entre las células que forman parte de un epitelio. El descenso en los niveles de E-cadherina genera un cambio de polaridad de la célula epitelial que promueve su migración mediante una EMT (revisado en Peinado et al., 2004; Acloque et al., 2009). Recíprocamente, un aumento de los niveles de la E-cadherina puede promover una MET, forzando a una célula mesenquimal migratoria a formar parte de un epitelio (Hajra and Fearon, 2002). Un ejemplo del papel de cadherinas en procesos de EMT durante la morfogénesis es el cierre del tubo neural. En estudios en embriones de pollo *in vivo* se observó que si bien durante la migración colectiva de las células de la cresta neural había bajos niveles de cadherinas en el frente, durante el cierre del tubo neural se producía un aumento de la expresión (Nakagawa and Takeichi, 1995). En estudios de la gastrulación en embriones de *Drosophila*, también se observó que durante el movimiento de las células que componen el epitelio del

blastodermo se producía una redistribución de la expresión de la E-cadherina. Así, en un estadio anterior a la gastrulación las cadherinas se encuentran acumuladas en la zona apical de la célula. Cuando el epitelio empieza a invaginarse se produce una disminución de los niveles de cadherinas además de una redistribución (Oda et al., 1998). En estudios realizados en melanocitos de mamíferos en cultivo se observó que en la unión de los melanocitos a los queratinocitos los niveles de E-cadherina eran altos. Defectos en la expresión de E-cadherina aumentaba la motilidad de los melanocitos y por lo tanto su capacidad invasiva (Tang et al., 1994).

Por otro lado, se ha observado que cambios en los niveles de expresión de las cadherinas pueden estar asociados a procesos cancerígenos. Así, en estudios realizados en cultivos celulares procedentes de tumores se encontró que células invasivas, las cuales no expresaban E-cadherina, se convertían en células no invasivas al suministrarles E-cadherina de forma exógena (Tang et al., 1994; Hajra and Fearon, 2002). Además, durante la migración de grupos de células tumorales, la expresión de las cadherinas en la periferia disminuye, manteniéndose niveles altos entre las células que conforman el grupo (Saha et al., 2007).

Como se ha comentado anteriormente, para que una célula migre es necesario que exista una dinámica en las adhesiones celulares. Esta dinámica viene regulada por genes activadores y represores de las cadherinas. Entre los factores de transcripción implicados en la activación e inhibición de las cadherinas caben destacar los genes *snail*, *twist* y *serpent*. *snail* actúa como un represor transcripcional de la E-cadherina. Así, durante el proceso de gastrulación, tanto en invertebrados como en vertebrados deficiencias en el gen *snail* impiden la inhibición de E-cadherina lo que produce defectos en la gastrulación (Cano et al., 2000). Asimismo, en experimentos en células epiteliales en cultivo, la transfección con *snail* producía una inhibición de E-cadherina y un fenotipo de invasión (Cano et al., 2000; Ip and Gridley, 2002). Además, en experimentos de células procedentes de líneas tumorales de páncreas, donde los niveles de E-cadherina son bajos, la transfección con ARN mensajero antisentido de *snail*, es capaz de restaurar los niveles de E-cadherina (Batlle et al., 2000).

Sin embargo, *twist* puede actuar tanto como represor como activador de cadherinas. Así, en el proceso de la formación del tubo neural es necesario que *twist* reprima a E-cadherina durante la migración del epitelio, al mismo tiempo que debe activar a N-cadherina para la fusión del tubo neural. Mutaciones en el gen *twist* muestran defectos en la expresión de N-cadherina y fallos en la formación del tubo neural (Oda et al., 1998; Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005; Zong et al., 2006; Lee et al., 2007).

Serpent, un factor GATA, también actúa como represor de la E-cadherina durante la migración del endodermo en el embrión de *Drosophila* durante la morfogénesis del intestino. Defectos en la expresión de Serpent mantienen la polaridad epitelial y los niveles de E-cadherina altos impidiendo la migración colectiva de las células que forman el endodermo anterior. Por el contrario, la activación continuada de Serpent resulta en una disminución drástica de la E-cadherina, impidiendo que las células del endodermo vuelvan a formar un epitelio (Campbell et al., 2011).

Estos datos implican a las cadherinas y su regulación en migración celular, durante el desarrollo embrionario y en metástasis, otorgándoles un importante papel en el control de la EMT.

1.1.2. Rho GTPasas y su papel en la migración celular

Como se ha mencionado anteriormente, para llevar a cabo la migración celular también son necesarios cambios en la dinámica del citoesqueleto de actina. Unas proteínas implicadas en la regulación de estos cambios son las Rho GTPasas. Las Rho GTPasas pertenecen a la familia Rho englobada dentro de la superfamilia Ras. Las proteínas más estudiadas por su relación con la migración celular pertenecientes a la familia de las Rho GTPasas son RhoA, Rac1 y Cdc42. Resultados de experimentos de fibroblastos en cultivo mediante inhibición y expresión ectópica de estas Rho GTPasas sugirieron que Rac1, RhoA y Cdc42 podrían desarrollar distintos papeles en la motilidad celular (Sander et al., 1999). Así, experimentos realizados en células en cultivo muestran que

tras la activación de Cdc42 se produce un incremento en la formación de filopodios. Por otra parte, la activación de Rac1 genera lamelipodios y ondulaciones en la membrana (Ridley et al., 1992; Machesky and Hall, 1997). Aunque Rac1 y Cdc42 tengan funciones similares en la migración debido a su papel en la formación de extensiones de membrana, Cdc42 juega además un papel en la regulación de la polaridad celular. Así, ensayos celulares de cicatrización o cierre de herida ("wound healing") con fibroblastos realizados por Nobes y Hall en 1999, mostraron que si bien Rac1 estaba implicada en la formación de protrusiones durante la migración de las células a través de la "herida", Cdc42 jugaba un papel importante tanto en la formación de los filopodios como en su localización. Así, un descenso en los niveles de Cdc42 producía una disminución en el número de filopodios formados y además, estas proyecciones se emitían alrededor de toda la célula y no solo en el frente de migración. Por otro lado, Rho tiene un papel fundamental tanto en la generación de fibras de estrés a través de su interacción con actina para generar adhesiones al sustrato, como en la contracción del cuerpo celular mediante su interacción con la miosina y desestabilización de las uniones al sustrato. Esto se ha mostrado en experimentos realizados en cultivos de fibroblastos donde se muestra cómo la activación de Rho produce un aumento de estas estructuras (Ridley and Hall, 1992; Ridley and Hall, 1994; Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996). En células cancerígenas también se ha observado que la inhibición de Rho reduce las adhesiones focales e induce la invasión celular (revisado en Heasman and Ridley, 2008).

Experimentos en cultivos celulares de mamíferos, han mostrado que existe una interacción entre los distintos miembros de la familia. Un efecto de esta interacción es el antagonismo que tiene lugar entre Rac1/Cdc42 y Rho, bien participando en la misma ruta de señalización o bien en rutas paralelas (Sander et al., 1999; Nobes and Hall, 1995; Lamarche et al., 1996). Esto se apoya en estudios realizados en células neuronales donde se analiza la segregación de protrusiones en respuesta a señales de retracción. Así, se ha observado que la inhibición de Rho induce la migración, el crecimiento del cono neural y las extensiones de los axones debido a la activación de Rac1 y Cdc42,

mientras que la activación de Rho produce un colapso una vez que los axones llegan a su destino (Kozma et al., 1997; Leeuwen et al., 1997). El análisis de la localización de la actividad de estas Rho GTPasas ha demostrado que si bien todas se activan en las protrusiones emitidas por la célula migratoria, lo hacen a distinta distancia respecto al borde celular. Así, Rho se encuentra activada a más distancia del borde de la protrusión que Cdc42 y Rac1. Además, la activación de estas Rho GTPasas también está regulada temporalmente durante el proceso de formación y desestabilización de las proyecciones. Así, mientras que Rac1 y Cdc42 están más activas en el frente de migración durante la formación de las protrusiones, la máxima activación de Rho se observa durante la estabilización de dichas protrusiones, mediante su adhesión al sustrato y durante la retracción de la protrusión (Nalbant et al., 2004; Pertz et al., 2006; Machacek et al., 2009).

Debido a la complejidad que conlleva el estudio de organismos en desarrollo, existen pocos datos sobre el funcionamiento de las Rho GTPasas en situaciones fisiológicas. Un ejemplo del papel de las Rho GTPasas durante el desarrollo embrionario, es en el desarrollo de la gónada del pez cebra, donde la actividad de Rac1 está implicada en la migración y formación de protrusiones en el frente de las células germinales, mientras que Rho se encarga de la retracción de las células y la dinámica en la adhesión (Kardash et al., 2010). Otro ejemplo durante el desarrollo es la migración de las glándulas salivares en embrión de *Drosophila* donde se ha observado que tanto la inhibición de Rac1, lo que genera disminución de protrusiones, como la sobreexpresión, lo que genera exceso de protrusiones emitiéndose al azar, resulta en defectos en la migración (Pirraglia et al., 2013). También ha sido ampliamente estudiado el cierre dorsal en *Drosophila*, donde Rho tiene un papel en la contracción celular, mientras que Rac1 y Cdc42 están involucradas en la migración regulando la formación de lamelipodios y filopodios, respectivamente, hasta su contacto (Brock et al., 1996; Lu and Settleman, 1999; Jacinto et al., 2002).

Además de su papel en la migración celular de forma directa, las Rho GTPasas se han implicado en la interacción con proteínas de adhesión como son las cadherinas, durante procesos de migración. En este

sentido, cumplen algunas funciones sobre estas proteínas como influir en el tráfico de las cadherinas y su reciclaje durante la migración celular influyendo de esta manera en el proceso de EMT. Además, esta regulación de la migración depende del tipo celular ya que, por ejemplo, en células epiteliales la expresión de la forma activa de Rac1 induce un incremento de la expresión de E-cadherina entre las células y una inhibición de su migración (Braga et al., 1997; Takaishi et al., 1997; Braga, 2002) mientras que, en experimentos en células de cáncer de páncreas se ha observado que la activación de Rac1 produce un descenso de E-cadherina y una inducción de la migración (Hage et al., 2009).

En resumen, Rho, Rac1 y Cdc42 son moléculas reguladoras espacio/temporales de las rutas de señalización implicadas en la migración celular.

1.1.2.1. Regulación de las Rho GTPasas

Las Rho GTPasas presentan dos estados conformacionales que dependen de su unión a GTP (activa) o a GDP (inactiva). La regulación de este ciclo de activación/inactivación va a depender de tres tipos de proteínas distintas: unas proteínas activadoras denominadas GEF del inglés ***G*uanine *N*ucleotide *E*xchange *F*actor**, las cuales catalizan la unión de las proteínas a GTP; unas proteínas inactivadoras GAP, que procede del inglés ***G*TPase *A*ctivating *P*roteins**, implicadas en la hidrólisis del GTP y la posterior unión de las Rho GTPasas a GDP; y unas proteínas inhibidoras de la disociación de nucleótidos de guanina, GDI del inglés ***G*uanine *N*ucleotide *D*isociation *I*nhibitor**, las cuales se mantienen unidas a las Rho GTPasas inhibiendo la asociación con el nucleótido de guanina previniendo así su activación (Kjoller and Hall, 1999, Fig.2).

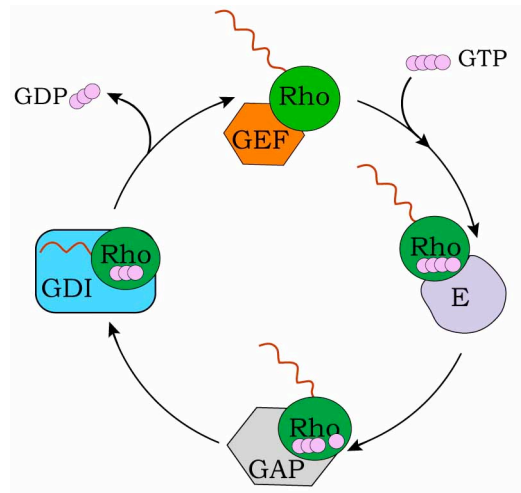


Figura 2.- Esquema de la activación de las Rho GTPasas mediada por las moléculas GEFs, GAPs y GDIs. Las Rho GTPasas interaccionan con los GEFs, las cuales permiten la unión al GTP y su posterior activación, lo que le permite la interacción con sus efectores (E). Una vez realizada la función, se inactivan por unión a los GAPs.

1.1.3. Los factores GEFs

Las GEFs son proteínas que se caracterizan por poseer múltiples dominios y por su divergencia estructural. Todas las GEFs poseen dominios catalíticos de unos 200 aminoácidos responsables de la actividad GEF, es decir, de catalizar la unión de las GTPasas a GTP. Las GEFs se clasifican en diferentes familias en función de sus dominios catalíticos. En el caso de las RhoGEFs el dominio catalítico es el dominio DH (dominio de homología a Dbp, RhoGEF en la tabla 1). Dbp es el primer RhoGEF descrito en mamíferos, el cual le da nombre a toda la familia. Aunque los dominios DH de las RhoGEFs contienen un núcleo común, la diferencia reside en su estructura tridimensional. Un dominio adyacente a DH situado hacia el extremo carboxi-terminal de la proteína, es el dominio de homología a Plescktrin, PH. El complejo, DH-PH, es común en todos los miembros de la familia Dbp, e interviene tanto en la localización en la membrana plasmática de las RhoGEFs como en regular la actividad catalítica (Tabla 1, revisado en Rossman et al., 2005).

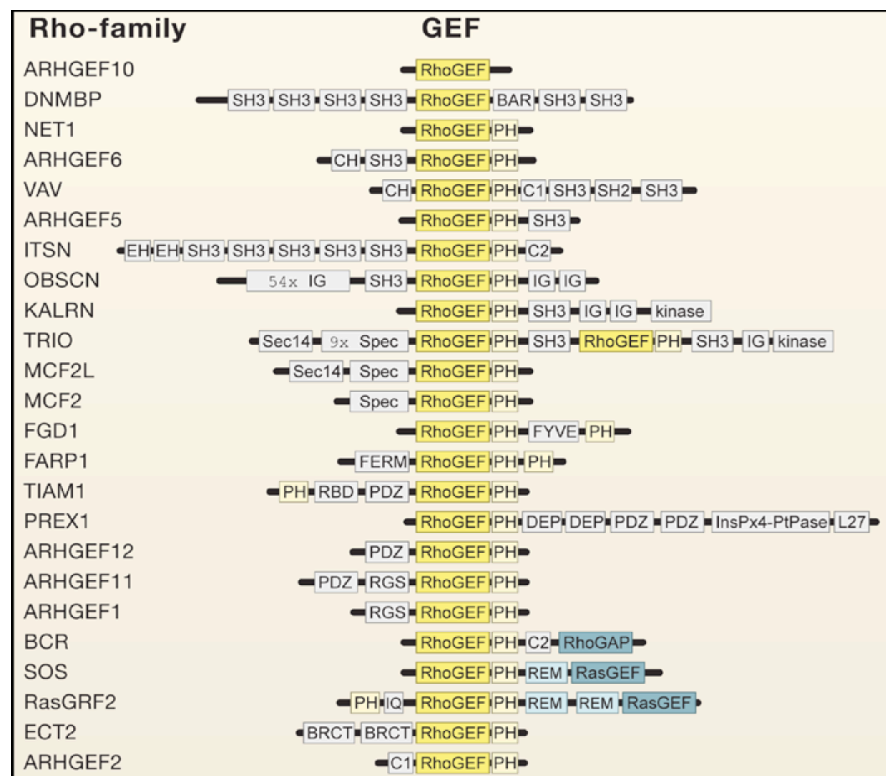


Tabla1- Tabla de GEFs reguladores de la superfamilia Ras modificada de Bos et al., 2007.

Los recuadros amarillos representan las familias con las que interactúan. Los recuadros azules indican otros miembros de la superfamilia Ras con las que pueden interactuar.

Esta regulación puede ser alostérica, por lo que el complejo DH-PH también funciona como un lugar de unión de proteínas adaptadoras. Un ejemplo de esto es la interacción del dominio PH del GEF Dbl con ezrin, una proteína implicada en migración celular y en reorganización del citoesqueleto de actina, que a su vez interactúa con Rho. Se ha visto que la interacción entre Dbl y ezrin regula la formación de adhesiones focales. Así, la coexpresión de ambas genera un aumento de adhesiones focales, y la expresión de la forma truncada de ezrin disminuye las adhesiones focales que genera Dbl a través de la activación de Rho (Vanni et al., 2004). Otro ejemplo de regulación alostérica es el caso de Trio, un caso único dentro de la familia Dbl. Trio contiene dos dominios de unión DH-PH, GEFD1 y GEFD2, con capacidad de unirse cada uno de ellos a más de una Rho GTPasa. Así, el dominio GEFD1 reconoce a RhoG/Rac1, mientras que el dominio GEFD2 reconoce a RhoA. Esta estructura hace que interactúe con distintas rutas de señalización. Experimentos en cultivos celulares mostraron que la transfección con el

dominio GEFD1 y GEFD2 por separado generaban ondulaciones de membrana producidas por Rac1 y fibras de estrés debidas a Rho, respectivamente. La co-transfección con ambos dominios generaban ambos efectos a la vez. Por lo tanto la activación de Trio en células en cultivo activa tanto a Rac1 como a Rho (Bellanger et al., 1998).

Otro caso particular de GEF que regula a varias GTPasas es el caso de Sos. Sos contiene un dominio DH-PH y un dominio específico de la GTPasa Ras, por lo que regula la activación tanto de Rac1 como de Ras. La unión de Sos a Rac1 o a Ras depende de su unión a proteínas adaptadoras. Así, para que Sos tenga una actividad Ras-GEF debe estar asociado a la proteína adaptadora Grb2 (Aronheim et al., 1994). De igual forma, para adquirir una actividad Rac-GEF debe estar asociado con el complejo Abi1/E3B1, Eps8 y PI3K. El papel de estas proteínas adaptadoras es la activación de Sos, además existe cierta competencia entre ellas (Innocenti et al., 2003).

Los dominios que se encuentran fuera del complejo DH-PH en los distintos GEFs son muy diversos. Algunas RhoGEFs contienen bucles de autoinhibición situados en el extremo amino-terminal. Estos bucles regulan negativamente al dominio catalítico DH, bloqueando así la accesibilidad a las Rho GTPasas. De hecho, se ha demostrado que deleciones del extremo amino-terminal de estas RhoGEFs resultan en su activación de forma constitutiva (Schmidt and Hall, 2002). Este es el caso del GEF Vav. Es una molécula compleja que contiene un dominio de homología a la calpolina (CH), una región ácida (Ac) con tirosinas conservadas, la región catalítica (DH-PH), una región C-terminal con dominios en dedos de Zinc (ZF), una secuencia rica en prolina (PR) y un dominio SH2 flanqueado por dos dominios SH3 (Bishop and Hall, 2000). Su activación constitutiva se produce cuando son eliminados los primeros 66 aminoácidos del extremo amino-terminal (Katzav et al., 1991). Vav ha sido situado corriente abajo de algunos receptores tirosina kinasas. Tras la estimulación de estos receptores, Vav es fosforilado, lo que produce la estimulación del dominio catalítico DH, pudiendo así interaccionar con las Rho GTPasas. En linfocitos, los receptores de las células B y T activos reclutan a Vav a través de proteínas adaptadoras que interaccionan con los dominios SH2/SH3

(Bustelo, 2000a). En estudios en migración de neutrófilos se observó que la proteína Vav era activado en el frente gracias a receptores tirosina kinasas como Src y Syk, lo cual orientaba a los neutrófilos hasta la zona de la inflamación (Schymeinsky et al., 2006).

Como se ha mencionado anteriormente, las RhoGEFs están implicadas en la activación de las Rho GTPasas, las cuales tienen importantes funciones durante la migración celular, concretamente en la reorganización del citoesqueleto. Por ello, fallos en las RhoGEFs se han relacionado con enfermedades en humanos como el cáncer. Un ejemplo de este tipo de RhoGEFs implicado en cáncer es el gen T-lymphoma invasion and metastasis 1 (Tiam-1), un GEF específico de la Rho GTPasa Rac1. Tiam-1 ha sido implicado en la migración e invasión celular a través de la activación de Rac1 en estudios en cultivos de celulares procedentes de linfomas (Bourguignon et al., 2000).

Aunque las Rho GTPasas se han implicado en migración celular durante el desarrollo, existen pocos estudios sobre el papel de las GEFs y los GAPs. Uno de estos estudios ha mostrado que la falta del GEF Rho-GEF durante la gastrulación en embriones de *Drosophila*, produce una falta de migración durante la invaginación del mesodermo (Barrett et al., 1997). Asimismo, el GEF para Rho1 *pebble* también se requiere para la migración del mesodermo durante la gastrulación en *Drosophila*. Sin embargo, en este caso la función de *pebble* en migración celular es independiente de Rho1 (Schumacher et al., 2004).

A continuación se describirá de manera más específica el papel del GEF Vav en la regulación de la migración celular por ser de relevancia para el trabajo aquí presentado.

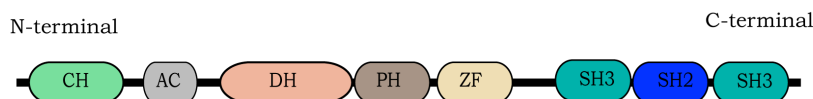
1.1.3.1. El GEF Vav en la migración

Uno de los GEF mejor caracterizados es Vav. En mamíferos se han identificado tres proteínas relacionadas estructuralmente con la familia Vav (Vav1, Vav2 y Vav3). Vav1 fue el primer miembro identificado en el laboratorio del Dr. Barbacid en 1989 como parte de un escrutinio para

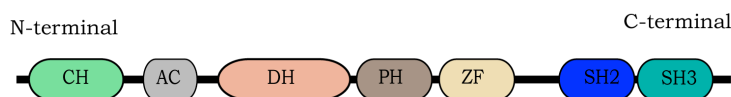
la búsqueda de oncogenes con la habilidad de transformar fibroblastos en cultivo (Katzav et al., 1989). Más tarde se describieron otras dos proteína pertenecientes a esta familia, Vav2 y Vav3. Los miembros de la familia Vav se diferencian entre sí por su patrón de expresión. Así, Vav1 se encuentra en las células madre hematopoyéticas y en algunos tejidos no hematopoyéticos como el páncreas, el esmalte dental y la capa del trofoblasto. Mientras que, Vav2 y Vav3 muestran un perfil de expresión más amplio, pudiendo localizarse en numerosos tejidos.

Las proteínas Vav se encuentran altamente conservadas en la escala evolutiva, desde vertebrados hasta invertebrados como *C. elegans* y *D. melanogaster* (Bustelo, 2001). La diferencia de Vav en las distintas especies reside en la región carboxi-terminal. Así, mientras que en mamíferos en esta región hay un módulo formado por los dominios SH3-SH2-SH3, en *Drosophila* falta el dominio SH3 más próximo al extremo amino-terminal y en *C. elegans* faltan ambos dominios SH3 (Fig.3).

Vav de mamíferos



Vav de *Drosophila melanogaster*



Vav de *Caenorhabditis elegans*

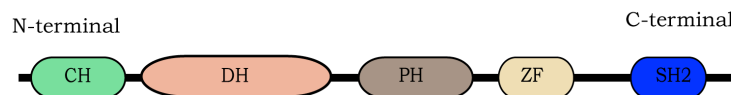


Figura 3.- Esquema de los dominios conservados de la proteína Vav en tres organismos: mamíferos, *Drosophila melanogaster* y *C. elegans*.

Como se ha mencionado en el apartado anterior, la función mejor conocida de Vav es su actividad catalítica como GEF a través de los

dominios DH-PH. Por dicha actividad, Vav se ha visto implicado en la regulación de la migración celular a través de la activación de Rac1 y Cdc42. Diferentes estudios han mostrado que Vav tiene un papel tanto inhibidor como promotor en la migración dependiendo del tipo celular. Un ejemplo del papel inhibidor de Vav en migración, se ha mostrado en células dendríticas procedentes de ratones nulos para Vav1 donde se observa que la eliminación de Vav1 incrementa la migración celular, debido a una disminución de la activación de Rac1 y por tanto de la actina polimerizada (F-actina) (Spurrell et al., 2009). Por el contrario, estudios en células epiteliales y fibroblastos, han mostrado que la activación de Vav2 incrementa la migración celular, la cual es inhibida mediante la expresión de las formas dominantes negativas de Rac1 y Cdc42 (Liu and Burridge, 2000a). Estos resultados demuestran que Vav2 regula la migración celular a través de Rac1 y Cdc42. Otro ejemplo del papel activador de Vav se observó en estudios realizados en células hematopoyéticas mutantes para Vav1 donde se muestra una disminución de la migración debido a descensos en los niveles de activación de Rac1/Cdc42 lo que sugiere que Vav promueve la migración celular (Sanchez-Aguilera et al., 2011).

Además del papel de Vav en migración celular descrito en cultivos celulares, también se conoce el papel que juega Vav en los procesos de migración que ocurren en situaciones fisiológicas normales y en situaciones patológicas. Un ejemplo del papel promotor de Vav en la migración celular en situaciones fisiológicas normales, es la migración de los neutrófilos durante la respuesta inflamatoria. En este caso, ratones nulos para el gen *vav* muestran una deficiencia en la migración de neutrófilos impidiendo su incorporación a la zona afectada (Schymeinsky et al., 2006; Graham et al., 2009). También se ha estudiado el papel de Vav en cultivos de celulares tumorales, donde se ha observado que la activación de las proteínas de la familia Vav, produce una activación de Rac1 induciendo el comportamiento metastático (Citterio et al., 2012; Lin et al., 2012).

El papel de Vav durante el desarrollo es también importante, aunque todavía es poco conocido. Se sabe que, por ejemplo, durante la migración de las células vasculares del músculo liso de mamíferos la

expresión de Vav3 induce la activación de Rac1, lo cual estimula la migración (Toumaniantz et al., 2010). En *Drosophila* también se ha visto la implicación de la interacción Vav/Rac1 en la orientación de los axones durante su migración (Malartre et al., 2010).

En este trabajo demostramos una implicación directa de Vav en migración celular en estudios realizados *in vivo* durante el desarrollo, al igual que su interacción con Rac1 y su relación con la reorganización del citoesqueleto de actina durante el desarrollo.

1.1.4. Receptores tirosina kinasas

Para que las células migratorias lleguen a su destino, es importante que la migración esté dirigida. Entre las moléculas implicadas en la orientación de la migración caben destacar los receptores tirosina kinasas (RTKs), los cuales son activados a través de estímulos externos.

Las proteínas tirosina kinasas pertenecen a una amplia familia con diversidad multigénica que se encuentra solo en los Metazoos. Estas proteínas activan rutas de señalización que intervienen en el crecimiento celular, diferenciación, adhesión, motilidad y muerte. En humanos, se han identificado 90 genes tirosina kinasas de los cuales 58 son receptores localizados en la superficie celular y se encuentran agrupados en 20 subfamilias (Robinson et al., 2000). Dentro de los receptores tirosina kinasas se encuentra el receptor de la insulina (INSR), receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR), receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), receptor de crecimiento vascular del endotelio (VEGF) o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) entre otros. Estos receptores se caracterizan por poseer dos dominios: uno extracelular que contiene regiones de unión a sus ligandos y otro intracelular o citoplasmático que contiene una región implicada en la regulación de la actividad catalítica kinasa. Inicialmente los receptores se encuentran en forma de monómeros que se dimerizan cuando son activados por sus ligandos, los cuales estimulan la actividad kinasa mediante la fosforilación del receptor. Una

vez fosforilados, se unen a proteínas citoplasmáticas dentro de las cuales se encuentran las GEFs.

Se ha mostrado que los receptores tirosina kinasas pueden regular y promover la migración celular. En cultivos primarios de oligodendrocitos y de células madre, se ha visto que PDGFR es capaz de dirigir la migración celular mediante quimiotaxis (Forsberg-Nilsson et al., 1998; Simpson and Armstrong, 1999). También se ha observado en experimentos *in vivo*, que receptores como PDGFR y VEGFR dirigen la migración de células mesenquimales hacia los lugares diana para la formación de órganos. Así, deficiencias en la expresión de estos receptores o su ligandos generan defectos en la migración y malformación de órganos. Esto se ha observado por ejemplo, en la formación de las gónadas de ratón y *Drosophila*, en la migración de hemocitos en el embrión de *Drosophila* y en la formación de la cresta neural en *Xenopus* (revisado en Hoch and Soriano, 2003) entre otros.

Los receptores tirosina kinasas realizan su función en la migración celular gracias a la interacción con las Rho GTPasas. Experimentos en cultivos celulares han mostrado que la activación de la Rho GTPasa Rac1 es debida a la activación de varios receptores tirosina kinasas como el PDGFR, el receptor de la insulina y el EGFR. Así por ejemplo, se observó que la estimulación de fibroblastos por PDGF resulta en un aumento de la migración de las células la cual se inhibe tras expresar una forma dominante negativa de Rac1 (Ridley et al., 1992; Anand-Apte et al., 1997). En experimentos en células cancerígenas en cultivo, se ha mostrado que la estimulación con EGF resulta en una activación de Rac1 y Cdc42 que favorece la formación de filopodios y lamelipodios (Sarmiento et al., 2008). Esta interacción también ha sido mostrada *in vivo* aunque su mecanismo es menos conocido debido a la complejidad del análisis en organismos completos. Así, se ha demostrado que mutaciones del receptor homólogo en *Drosophila* del VEGF de humanos produce un descenso de los niveles de Rac1 en los hemocitos del embrión y defectos en la migración de los mismos (Cho et al., 2002).

Las interacciones que tiene lugar entre los receptores tirosina kinasas y las Rho GTPasas pueden ser mediadas por proteínas adaptadoras. Unas

buenas proteínas de enlace entre los receptores tirosina kinasas y las GTPasas son las proteínas del tipo GEF, las cuales interaccionan con los RTKs a través de los dominios SH2 ó SH3. Un ejemplo de esta interacción en migración celular, es el caso del RTK VEGFR con Vav2 en células endoteliales. Así, se ha demostrado que VEGFR fosforila a Vav2 lo que produce una activación de Rac1 e inducción de la migración celular (Garrett et al., 2007).

En resumen, los receptores tirosina kinasas juegan un papel fundamental en la migración celular dirigida, ya que su activación por señales externas, activan una cascada de señalización que a través de GEFs y Rho GTPasas controlan la reorganización del citoesqueleto y así la migración celular.

Hemos visto que los mecanismos moleculares por los cuales las Rho GTPasas y sus activadores, los GEFs, regulan la migración celular han sido mayoritariamente descritos *in vitro* o *in vivo* mediante experimentos en cultivos celulares. Por ello, poco se sabe de su función en situaciones fisiológicas normales en el contexto de un organismo vivo. En esta tesis utilizaremos como modelo de migración las células del borde del ovario de *Drosophila melanogaster* para tratar de descifrar *in vivo* el papel de estas proteínas reguladoras del citoesqueleto de actina durante procesos de migración celular que tienen lugar durante el desarrollo.

2. LAS CÉLULAS DEL BORDE COMO SISTEMA MODELO PARA EL ESTUDIO DE LOS MECANISMOS QUE REGULAN LA MIGRACIÓN CELULAR

El sistema reproductivo de la hembra adulta de *Drosophila melanogaster* está compuesto por dos ovarios situados en el abdomen. Cada ovario tiene aproximadamente entre 16 y 20 ovariolas, conteniendo cada una de ellas una hilera de 14 cámaras huevo en distintos estadios del desarrollo comprendiendo desde el estadio 1 (S1) hasta el estadio 14 (S14) (Fig.4 A). En el extremo anterior de las ovariolas se localiza el germario, en el cual residen las células madre, entre las que se encuentran las células madre de la línea germinal y las células madre de la línea somática (FSCs) (Lin and Spradling, 1993; Margolis and Spradling, 1995; Decotto and Spradling, 2005). Las células madre de la línea germinal darán lugar a 15 células nutricias (NCs) y un oocito. Las células nutricias sintetizan y proveen de los nutrientes necesarios al oocito que dará lugar al nuevo huevo. La línea somática, dará lugar a las células foliculares (FCs), las cuales constituyen una monocapa denominada epitelio folicular, que rodea a las células de la línea germinal para formar la cámara huevo. Las células del epitelio folicular, en su inicio, adquieren una morfología cuboidal, a excepción de un par de células foliculares especializadas situadas en ambos extremos de la cámara huevo denominadas células polares (PCs). Durante el desarrollo, las células foliculares que forman parte del epitelio sufren una serie de reagrupaciones y movimientos. Por un lado, la mayoría de las células foliculares se retraen sobre las células nutricias hacia la parte posterior de la cámara huevo durante el estadio 9 (S9), para acabar rodeando al oocito en el estadio 10 (S10). En este mismo proceso, el resto de células foliculares, denominadas stretch cells, quedarán estiradas recubriendo a las células nutricias (Fig.4 B y C). Por último, un grupo especializado de células foliculares anteriores se delaminarán del epitelio y migrarán a través de las células nutricias durante el S9 hasta contactar con el oocito en el S10. Este grupo de células foliculares denominadas células del borde (BCs) se usan como sistema modelo para estudiar migración de células *in vivo* (Fig.4 A y B).

2.1. Especificación de las células del borde

Durante el estadio 8, las células polares poseen la función de reclutar a las células foliculares vecinas para formar el grupo de las células del borde migratorias (Liu and Montell, 1999; Silver and Montell, 2001). El número de células foliculares que forman el grupo de las células del borde, es proporcional al número de células polares. Así en una situación silvestre, donde hay dos células polares, el número de células del borde externas oscila entre 6 y 8, mientras que si el número de células polares incrementa se produce un aumento en el número de células foliculares reclutadas (Grammont and Irvine, 2002; Liu and Montell, 1999; Zhang and Kalderon, 2000).

El reclutamiento de las células foliculares para formar el grupo de las células del borde, depende de rutas de señalización específicas. Una de estas rutas es la ruta de señalización JAK/STAT. Como componentes de esta ruta encontramos un ligando llamado Unpaired (Upd), un receptor llamado Domeless (Dome), una Janus kinasa conocida como Hopscotch (Hop) y el factor de transcripción Stat92E (Stat). Células del borde mutantes para *hop* y *stat* no son reclutadas para formar el grupo (Beccari et al., 2002; Silver and Montell, 2001). En experimentos en los cuales se elimina Upd de las células polares, se produce una inhibición del reclutamiento de las células foliculares y un bloqueo de la migración (Silver and Montell, 2001). Estos resultados sugieren que el ligando Upd se produce en las células polares activando a la ruta de JAK/STAT en las células foliculares vecinas, dando lugar a la formación del conjunto de las células del borde y su posterior migración durante el estadio 9.

Además de su papel en reclutar las células del borde, la ruta JAK/STAT regula la expresión de una batería de genes que se requieren para la migración de las células del borde. Uno de los genes regulados por la ruta JAK/STAT es el gen *slow border cell (slbo)*. Este gen codifica el homólogo en *Drosophila* del factor de transcripción C/EBP de mamíferos y su expresión aparece justo antes de que tenga lugar la migración de las células del borde (Montell et al., 1992). Mutaciones en el gen *slbo* producen falta de migración. En células del borde mutantes para Stat no se detecta expresión de la proteína Slbo al igual que la activación

ectópica de JAK/STAT resulta en la activación ectópica de Slbo (Silver and Montell, 2001; Beccari et al., 2002). Esto sugiere que STAT actúa corriente arriba de Slbo.

El factor de transcripción Slbo regula la expresión de la mayoría de los genes que son esenciales para la migración de las células del borde como son *DE-cadherina* (*DE-cad*), *Jing* y *focal adhesion kinase* (*FAK*) entre otros (Niewiadomska et al., 1999; Liu and Montell, 2001; Bai et al., 2000).

2.2. Migración de las células del borde

Una vez que el grupo de células foliculares ha adoptado el destino de células del borde empiezan a migrar a través de las células nutricias durante el estadio 9 (Montell, 2003). Para que este proceso ocurra, las células del borde necesitan romper el contacto que mantienen con las células vecinas de la parte anterior de la cámara huevo y separarse del epitelio folicular en un proceso similar a la transición epitelio-mesénquima (EMT). En este proceso las células foliculares pierden su polaridad epitelial excepto las dos células polares que quedarán situadas en el centro del grupo de las células del borde y que no se mueven, sino que son arrastradas por el resto del grupo. Este grupo migra de forma colectiva a través de las células nutricias, estableciendo un frente de migración (Fig.4 A y B). En este frente de migración es donde se acumula de forma preferencial la F-actina y donde tiene lugar la formación de la mayoría de las extensiones de membrana necesarias para el movimiento del grupo hacia el oocito (Montell, 2003). Durante la migración se produce a la vez un movimiento de rotación de las células del borde externas alrededor de las células polares, por lo que la célula que se encuentra en el frente no es siempre la misma, aunque el frente de migración se mantiene (Fig.5). Esta es la principal diferencia entre este tipo de migración colectiva y la migración colectiva de las capas de epitelio donde las células que se localizan en el frente de migración son siempre las mismas, como es el caso de la cresta neural (Theveneau and Mayor, 2012). Una vez que las células del borde han llegado al oocito, migran dorsalmente hasta llegar al núcleo de este. De esta manera podrán cumplir con su papel en la formación de un orificio denominado

micrópilo, cuya función es permitir la entrada del espermatozoides del macho para la fecundación del huevo (Montell et al., 1992; Edwards et al., 1997). Se ha estimado que la migración de las células del borde tiene una duración de 6 horas (Montell et al., 1992).

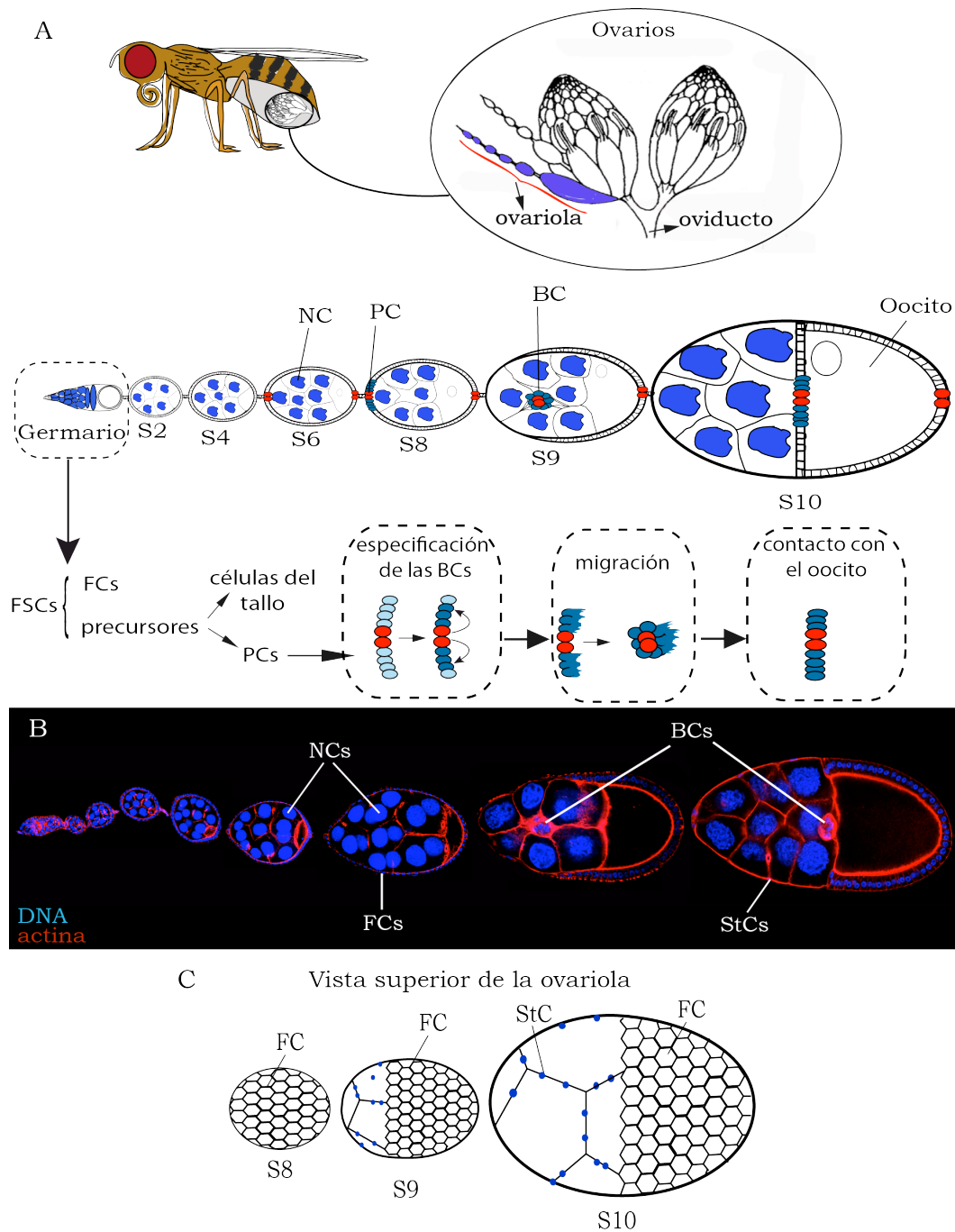
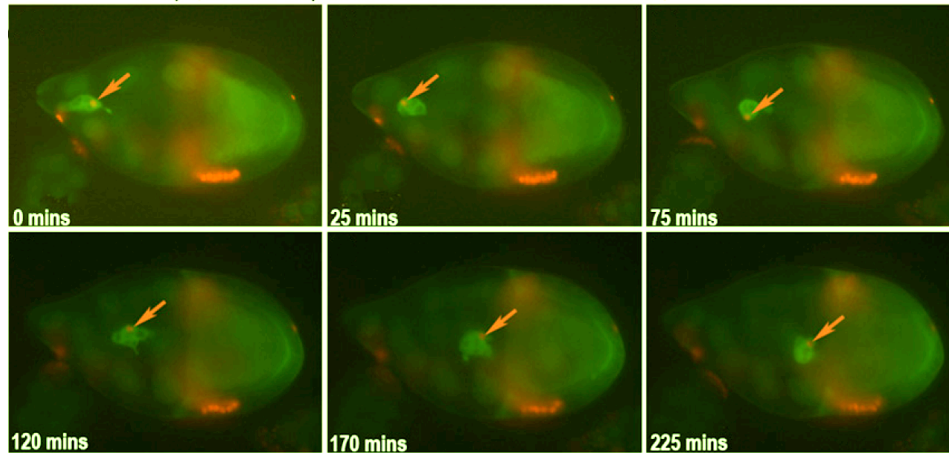


Figura 4.- Esquema del ovario de la hembra de *Drosophila melanogaster*.

A) Esquema de una ovariola en la cual se muestra la formación y migración de las BCs. B) Imagen tomada con microscopio confocal de una ovariola en la que se señala las células foliculares que forman el epitelio folicular (FC), las stretch cells (StCs), las células nutricias (NC) y las células del borde (BCs). Se ha marcado la actina con rhodamin-phalloidin (rojo) y el DNA con TOPRO-3 (azul). C) Esquema de cámaras huevo S8, S9 y S10 mostrando las células foliculares (FCs) y las stretch cells (StCs).

**Figura 5.- Dinámica de la migración de las BCs extraído de Prasad and Montell, 2007.**

Secuencia de imágenes en las que se muestra el movimiento de rotación de las BCs y donde se ha marcado una célula individual que permite seguir su posición en el grupo a medida que este migra (flecha roja).

2.3. Moléculas implicadas en la migración de las células del borde

2.3.1. La hormona Ecdisona

Una vía clave en la migración de las células del borde, es la ruta de señalización de la hormona esteroidea ecdisona (Bai et al., 2000). Esta cascada de señalización contribuye al momento de inicio de la migración de las células del borde. La ruta fue descubierta a través de la caracterización del receptor co-activador *taiman* (*tai*), el cual fue identificado en un escrutinio de mutaciones que causaban defectos en la migración de las células del borde. El locus de *tai* codifica el homólogo

de *Drosophila* de la proteína humana AIB1 el cual se encuentra incrementado en cáncer de mama y de ovario.

La ruta de la hormona esteroidea ecdisona está compuesta por un receptor de ecdisona unido a un receptor co-activador. El receptor ecdisona funcional es un heterodímero de dos subunidades, la subunidad del receptor ecdisona (EcR) y la subunidad Ultraespiracle (Usp). El receptor co-activador está codificado por *taiman* (*tai*). Durante el estadio 9, se produce un pico de síntesis de la hormona ecdisona (Riddiford et al., 1993). Este aumento de la concentración de la hormona en la cámara huevo activa a EcR, Usp y Tai en las células del borde. La eliminación de Usp o Tai de las células del borde resulta en una falta de migración. Además, la falta de función de *tai* no afecta a la expresión de *Slbo* y viceversa, lo que sugiere que la ruta de *tai* actúa independientemente de *slbo*. Por otro lado, se han encontrado niveles elevados de DE-cad y armadillo (β -catenina) en las uniones entre las células del borde en mutantes para *tai*, lo cual sugiere un papel para esta ruta en el reciclaje de complejos de adhesión durante la migración (Bai et al., 2000). Por último, en células del borde mutantes para *tai* la distribución de la quinasa relacionada con adhesiones focales, FAK56 (DFak56), también está alterada (Fox et al., 1999; Palmer et al., 1999; Fujimoto et al., 2013). Por tanto, el modelo más defendido es que la ruta de la hormona esteroidea controla la migración de las células del borde mediante el reciclaje de proteínas presentes en las adhesiones celulares, como de la DE-cad y de FAK.

2.3.2. DE-cadherina

Como se ha mencionado anteriormente, los cambios en la adhesión celular durante el proceso de migración incluye la desunión de las células migratorias de sus vecinas del epitelio y la formación de nuevas adhesiones dinámicas al substrato.

Niewiadomska y colegas estudiaron el papel de DE-cad durante la migración de las células del borde. Observó que en cámaras huevo silvestres la DE-cad muestra un patrón de expresión dinámico. Antes de la migración, en el estadio 8, la expresión de DE-cad incrementa

uniformemente alrededor de la superficie de las células polares. Durante la formación del grupo de las células del borde, la expresión de la *DE-cad* aumenta especialmente en las células foliculares que formarán parte del grupo (Fig.6 A). Una vez formado el grupo, durante la migración en el estadio 9 los niveles de *DE-cad* entre las células del borde y las células nutricias disminuyen, manteniéndose altas entre las células del borde y las células polares, así como entre las propias células polares (Fig.6 B). En el estadio 10 donde las células del borde han contactado con la membrana del oocito, la *DE-cad* queda acumulada en la zona de las uniones celulares (Fig.6 C). El homólogo en *Drosophila* del gen E-cadherina de humanos es el gen *shotgun* (*shg*). En los grupos de células del borde en los cuales todas las células son mutantes para *shg*, se produce un retraso de la migración (Niewiadomska et al., 1999). Además, se observó que en células del borde compuestas por células silvestres y células mutantes para *shg* también se producía un retraso en la migración, donde las células silvestres siempre se encontraban localizadas en el frente del grupo, mientras que las células mutantes se localizaban en la parte de atrás. Esto sugiere que la *DE-cad* se requiere para la migración pero no para la adhesión entre las células del grupo, a pesar de la alta expresión de esta proteína entre las células del borde. Por otra parte, se observó que cuando las *DE-cad* son eliminadas de las células nutricias, las células del borde no migran correctamente, sugiriendo que para la migración de las células del borde es necesario unos niveles de expresión de *DE-cadherina* tanto en el sustrato, las células nutricias, como en las propias células del borde (Niewiadomska et al., 1999). Finalmente, en este estudio se sugirió que la formación inicial del grupo de las células del borde también dependía de los niveles de expresión de *DE-cad*. Así, las células foliculares mutantes para *DE-cad* son discriminadas frente a las que poseen altos niveles durante la formación del grupo de las células del borde (Niewiadomska et al., 1999).

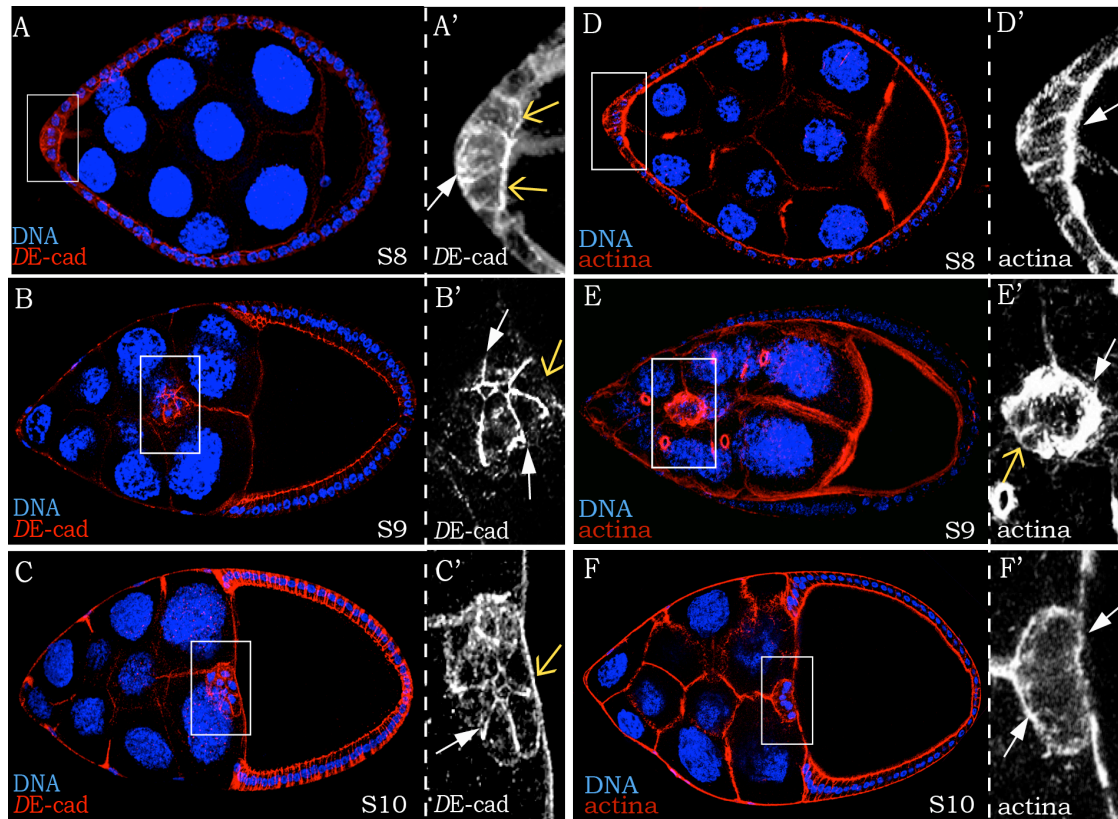


Figura 6.- Localización de la cadherina y actina durante la migración de las células del borde.

(A-F) Cámaras huevo silvestres de estadio 8, 9 y 10. (A, B y C) Localización de cadherina. En todos los casos la cadherina está marcada con el anticuerpo anti-DE-cad (rojo) y un marcador de DNA, TOPRO-3 (azul); (A) Se observa que en S8, los niveles de DE-cad se encuentran más altos en las PCs (flecha blanca) y en las células foliculares adyacentes (flecha amarilla); (B) En S9, el nivel de DE-cad que se encuentra entre las células del borde (flecha blanca) es mayor que entre las BCs y las NC (flecha amarilla); (C) En S10 la DE-cad queda acumulada en la zona de contacto con el oocito (flecha amarilla), manteniéndose entre las BCs (flecha blanca). (D, E y F) La localización de la F-actina es observada con una tinción de rhodamine-phalloidin (rojo). En S8 se concentra en el frente del grupo de las células del borde (flecha blanca) y entre ellas mismas. (D), durante la migración en el S9 se acumula en el frente (flecha blanca) (E), siendo menor en la parte de atrás (flecha amarilla) mientras que en S10 la actina se localiza de forma uniforme en la periferia de las BCs (F). (A'-F') Imagen ampliada de las BCs.

2.3.3. Las Rho GTPasas

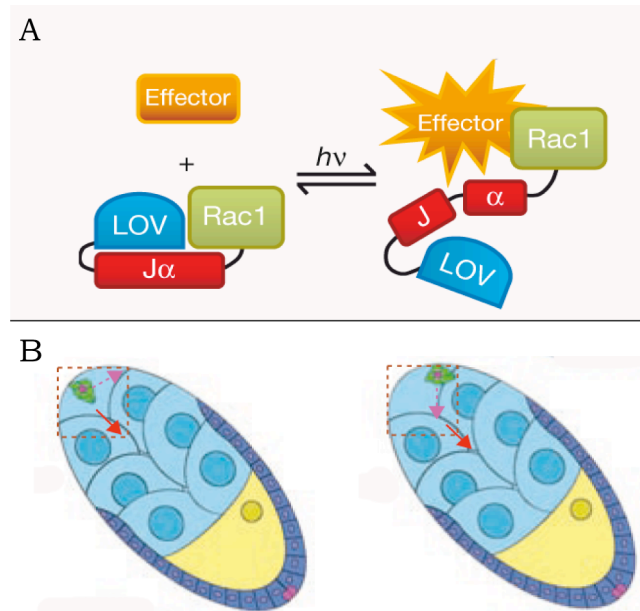
Durante el inicio de la migración, las células necesitan una reorganización del citoesqueleto de actina para favorecer la formación de proyecciones en el frente de la migración (Verkhusha et al., 1999). En el estadio 8, durante la formación de las células del borde, la actina se

encuentra acumulada entre las células foliculares que formarán el grupo de las células del borde y en el frente entre estas células y las células nutricias (Fig.6 D). Cuando las células del borde migran en el estadio 9, se produce una reorganización de actina acumulándose en la periferia del grupo, encontrándose una mayor acumulación en el frente, en dirección a la migración, respecto a la parte de atrás (Fig.6 E). Una vez que las células del borde contactan con el oocito, la actina se localiza más uniformemente en la periferia del grupo (Fig.6 F).

Como se ha mencionado a lo largo de la introducción, uno de los principales reguladores de la reorganización del citoesqueleto de actina son las pequeñas proteínas GTPasas pertenecientes a la familia Rho, siendo las más significativas en cuanto a la migración Rho, Cdc42 y Rac. En las células del borde, la pérdida de los tres genes que codifican para las tres proteínas Rac existentes en *Drosophila*, Rac1, Rac2 and Mtl, resulta en una falta completa de la migración y una disminución de los niveles de actina (Geisbrecht and Montell, 2004). El mismo resultado se obtiene cuando la forma dominante negativa de la proteína Rac1 (RacT17N) se expresa específicamente en las células del borde (Murphy and Montell, 1996; Duchek and Rorth, 2001).

Recientemente se ha mostrado que en las células del borde existe una asimetría en la activación de Rac1, siendo mayor en el frente. Esto se mostró en estudios de FRET (**F**luorescence **R**esonance **E**nergy **T**ransfer), mediante los cuales se observó que en células del borde silvestres la activación de Rac1 estaba localizada en las protrusiones del frente (Wang et al., 2010c). Asimismo, estos estudios utilizaron una forma fotoactivable de Rac1 (PA-RacQ61L) en las células del borde para demostrar que la activación de Rac1 en una región distinta del frente, ocasionaba la formación de protrusiones en esta región y un cambio en la dirección de la migración de forma que las células migraban ahora en la dirección marcada por la zona donde se había activado Rac1. Aún más, se observó el efecto contrario cuando la forma fotoactivable de Rac1 usada era una forma dominante negativa (PA-RacT17N). De tal manera que, cuando se estimulaba PA-RacT17N en el frente de las células del borde se producía una inhibición de la migración (Wang et al., 2010c) (Fig.7). En resumen, todos estos resultados demuestran que

la activación de Rac1 se requiere para la formación localizada de protrusiones en el frente, estableciéndose así la dirección de la migración.



Modificada de Wang et al., 2010.

Figura 7.- Esquema de PA-RacQ61L fotoactivable.

A) Esquema de la construcción de PA-RacQ61L fotoactivable, donde Rac1 está fusionado al fotoreactivo LOV (light oxygen voltage) impidiendo su activación. Cuando se incide con láser, se disocia el complejo Rac1-LOV y se activa a Rac1. B) Esquema en el cual se muestra las BCs en verde, la dirección normal de migración (flecha roja) y la dirección que toman las BCs cuando se fotoactiva a Rac1 en otras regiones del grupo diferentes de la del frente (flecha rosa).

2.3.3. RTKs

Las células del borde migran directamente a través de las células nutricias por el centro de la cámara huevo hasta llegar al oocito sin desviarse de su camino. Se ha visto que las rutas de dos **Receptores** **Tirosina** **Kinasas** (RTKs), PVR, que procede del inglés **P**latelet-Derived **G**rowth Factor/**V**ascular Endothelial Growth Factor **R**eceptor y EGFR, del inglés **E**pidermal **G**rowth Factor **R**eceptor, desempeñan un papel crucial en la regulación de la direccionalidad de la migración de las células del borde (McDonald et al., 2003; McDonald et al., 2006). El modelo actual propone que esta migración dirigida se produce gracias a la secreción desde el oocito de los ligandos de los receptores PVR y EGFR que

actuarán como quimioatrayentes. Se piensa que se forman unos gradientes de estos ligandos en la cámara huevo de forma que el frente de las células del borde lee más cantidad de ligandos, lo que conlleva a la activación preferencial de los RTKs en esta zona.

Mediante un escrutinio de mutantes que afectaban a la migración de las células del borde, se identificó a Pvf1 como el ligando de PVR en el contexto de las células del borde. Las hembras homocigóticas para la mutación Pvf1 presentaban un retraso en la migración similar a la expresión de una forma dominante negativa de PVR en las células del borde (Fig.8 D), sugiriendo a Pvf1 como ligando de PVR en este proceso (Duchek et al., 2001a). Por otra parte, se sabe que todos los ligandos identificados para EGFR, Gurken, Vein y Spitz, se requieren para la correcta migración de las células del borde, ya que la eliminación individual de cualquiera de estos ligandos resulta en un fenotipo de migración similar al que se obtiene cuando se expresa una forma dominante negativa de EGFR (Duchek and Rorth, 2001) (Fig.8 C).

Por último se sabe que la coexpresión de las formas dominantes negativas de los dos RTKs en las células del borde resultaba en un retraso en la migración que era mayor que el causado por la expresión de cada uno de forma individual (Fig.8 F). Esto sugiere que PVR y EGFR actúan de forma redundante en la migración de las células del borde (Duchek and Rorth, 2001; Duchek et al., 2001).

Experimentos de FRET demostraron que la expresión de las formas dominantes negativas de PVR o EGFR en las células del borde provocaban una disminución de la activación de Rac1 en el frente del grupo. Asimismo, la expresión de las formas activas producía una activación homogénea de Rac1 en todo el grupo. Estos resultados demostraron que las rutas de señalización de PVR y EGFR controlaban la migración de las células del borde mediante la regulación de la actividad de Rac1 (Duchek and Rorth, 2001; Duchek et al., 2001; McDonald et al., 2003; Wang et al., 2010).

Una vez que las células del borde han llegado al oocito tiene lugar una migración dorsal. Esta migración dorsal requiere de la activación de

EGFR por uno de sus ligandos, Gurken (Grk), y no de PVR. Así, la pérdida de función de Gurken en la parte dorsal de la cámara huevo, produce una inhibición de la migración dorsal de las células del borde (Duchek and Rorth, 2001; Duchek et al., 2001).

Sin embargo, si bien se sabe que las rutas de señalización de EGFR y PVR controlan la migración de las células del borde a través de la activación de Rac1, se desconoce el mecanismo molecular por el cual tiene lugar este proceso.

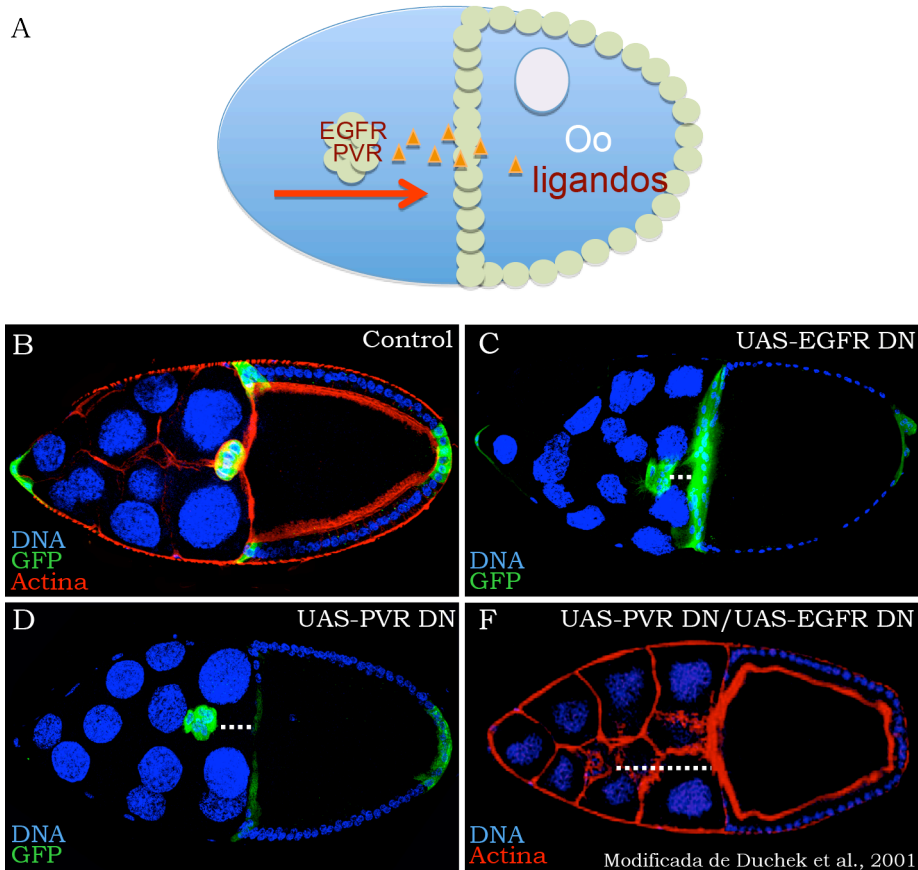


Figura 8.- Fenotipo de migración de las formas dominantes negativas de PVR y EGFR.

A) Esquema representando el mecanismo de migración en el cual los ligandos secretados por el oocito activan a las RTKs en el frente. (B-F) Panel de cámaras huevo en estadio 10 donde en la situación control las BCs han llegado al oocito (B) mientras que la expresión de las formas DN de EGFR y PVR producen un retraso (C y D). La coexpresión de los DN produce un incremento del fenotipo (F).

En esta tesis hemos identificado varios genes que se requieren para la migración de las células del borde. Entre ellos, destacamos el gen Vav el

cual proponemos que actúa como intermediario entre los RTKs PVR y EGFR, y la activación de Rac1.

Objetivos

La migración celular juega un papel clave en una gran variedad de procesos biológicos que tienen lugar tanto durante la embriogénesis como en el individuo adulto. El avance en el conocimiento de los mecanismos que regulan la migración celular es pues esencial para entender tanto el desarrollo embrionario como patologías humanas como la metástasis o procesos fisiológicos normales como la migración de fibroblastos durante la cicatrización. El objetivo principal de esta tesis es aislar y caracterizar nuevos genes implicados en la regulación de la migración celular. Durante el desarrollo muchas poblaciones celulares migran grandes distancias desde los lugares donde han nacido. Cada uno de estos tipos celulares sigue patrones de migración específicos que son regulados espacial y temporalmente a lo largo del desarrollo. Para conseguir que cada tipo celular siga su patrón de migración, en todo momento se deben tomar decisiones sobre cuando migrar, el camino a tomar y cuando parar. La migración de las células del borde durante la oogénesis de *Drosophila* constituye un sistema particularmente atractivo para el estudio *in vivo* de los mecanismos que controlan los diferentes aspectos de la migración celular. En este trabajo hemos utilizado este sistema modelo para tratar de identificar un aspecto particular de la migración dirigida, la señalización corriente abajo de los receptores de las moléculas guías EGF y PVF, los receptores tirosina kinasas EGFR y PVR. Para ello, hemos seleccionado un grupo de genes que se aislaron en un escrutinio para identificar proteínas que interaccionaban con los dominios citoplasmáticos de PVR y EGFR, realizado en el laboratorio de la Dra. Pernille Rorth, donde se utilizó el método de doble híbrido en levaduras usando como proteínas cebo los dominios citoplasmáticos de PVR y EGFR y como proteínas presa proteínas obtenidas de una librería de cDNA (DNA copia) de *Drosophila* (Duchek and Rorth, 2001). Los genes seleccionados han sido: *Spt6*, CG1135, CG2887, CG33993 y *vav*. Por otra parte, también se decidió incluir en el estudio el gen *coracle* por dos razones, en primer lugar por su implicación en la regulación del citoesqueleto de actina en procesos de migración en células en cultivo (Ruiz-Sáenz et al., 2011) y en segundo lugar por su interacción con EGFR observada en el ojo de

Drosophila (Fehon et al., 1994). El objetivo principal se dividió en dos objetivos más concretos:

1. Buscar y caracterizar genes implicados en la respuesta celular corriente abajo de EGFR y PVR durante el proceso de migración.

Para este fin vamos a:

- Estudiar la posible implicación de los genes *Spt6*, CG1135, CG2887, CG33993, *coracle* y *vav* en la migración de las células del borde.

Debido a que Vav se ha visto implicado en las rutas EGFR/PVR en células en cultivo tanto *in vivo* como *in vitro* y a su papel principal como Rac-GEF decidimos:

2. Estudiar los mecanismos moleculares y celulares mediante los cuales Vav regula la migración de las células del borde.

Para realizar este objetivo procedimos a:

- Establecer el papel de Vav en la dinámica de las proyecciones durante la migración de las BCs.

- Analizar la capacidad de Vav de actuar como GEF para Rac1 en BCs.

- Estudiar la interacción genética entre Vav y los receptores tirosina kinasas EGFR y PVR.

- Analizar la interacción de Vav con otros GEFs durante la migración de las BCs.

Resultados

1 BÚSQUEDA DE NUEVOS GENES IMPLICADOS EN LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS DEL BORDE.

Como se ha mencionado en la introducción, la migración de las BCs es un proceso de migración colectiva dirigida. Los factores de crecimiento PVF y EGF producidos por el oocito dirigen a las BCs en su migración a través de las células nutricias hasta que éstas contactan con la pared anterior del oocito (Duchek et al., 2001; Duchek and Rorth, 2001). A su vez, las BCs expresan los receptores para estos factores, los cuales tras ser activados por unión a sus ligando activan a la Rho GTPasa Rac1, la cual promueve la formación de protrusiones en el frente de migración (Duchek and Rorth, 2001; Duchek et al., 2001; McDonald et al., 2003; Wang et al., 2010). Ahora bien, por el momento se desconocen los mecanismos moleculares por los cuales los receptores tirosina kinasas, EGFR y PVR, activan a Rac1 en las BCs. En este trabajo se propuso tratar de identificar dichos mecanismos.

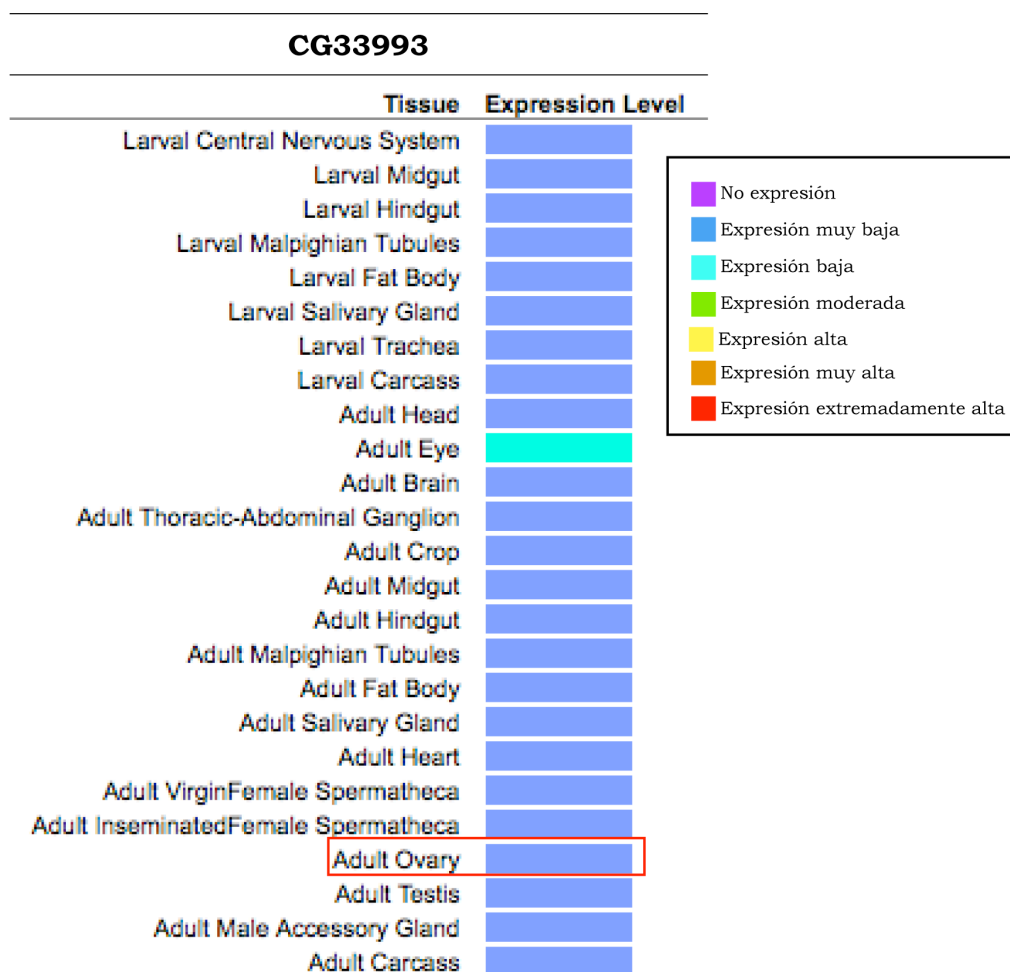
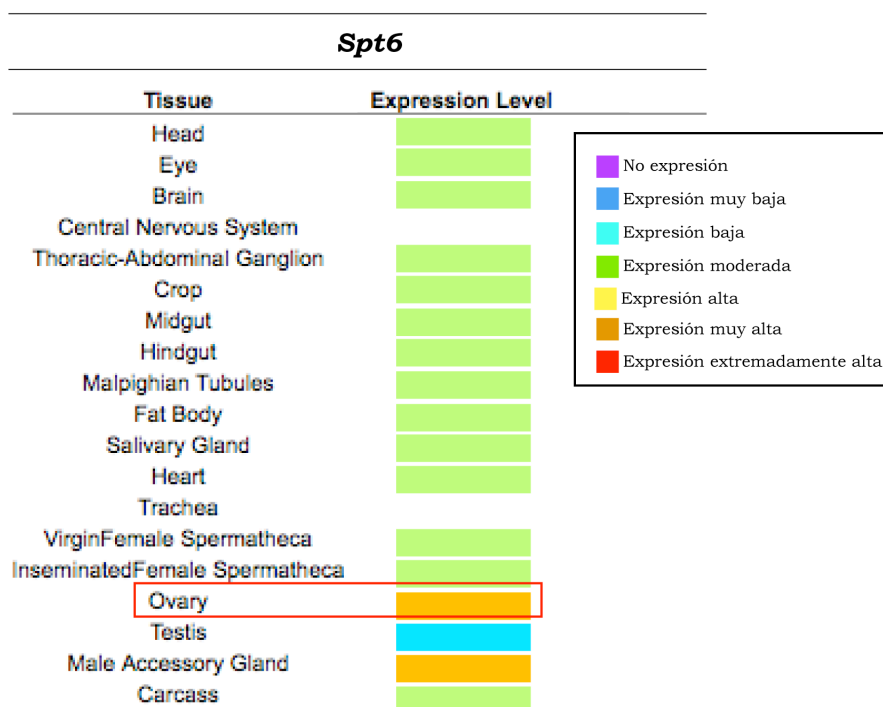
1.1 Identificación de genes corriente abajo de las vías de señalización de PVR y EGFR.

En los últimos años, se han llevado a cabo varios escrutinios, tanto genéticos como bioquímicos, con el fin de identificar genes que interaccionen con los receptores PVR y EGFR. En uno de estos escrutinios, donde se utilizó el método de doble híbrido en levaduras usando como proteínas cebo los dominios citoplasmáticos de PVR y EGFR y como proteínas presa proteínas obtenidas de una librería de cDNA (DNA copia) de *Drosophila*, se aislaron una treintena de proteínas que interaccionaban con los dominios citoplasmáticos de PVR y EGFR. Algunos de estos candidatos eran ya intermediarios conocidos de dichos receptores, como Shc, Dock o Abelson (Abl), mientras que otros eran novedosos. En este trabajo se eligieron algunos de los candidatos nuevos para el estudio de su posible papel en la regulación de la migración de las BCs corriente abajo de PVR y EGFR. Asimismo, se decidió incluir en este estudio la proteína Coracle, por su interacción con EGFR observada en el ojo de *Drosophila* (Fehon et al., 1994) y por su implicación en la regulación del citoesqueleto de actina en procesos

de migración en células en cultivo (Ruiz-Sáenz et al., 2011). Así, los genes que se decidieron estudiar en este trabajo fueron: *Spt6*, *CG33993*, *CG2887*, *CG1135*, *vav* y *coracle*.

Antes de iniciar el análisis funcional de estos genes, se decidió consultar la información que existía sobre los mismos en la base datos de *Drosophila* (FlyBase), ya que en ciertos casos esta información nos podía dar una idea tanto de su función biológica como de su expresión en tejido adulto, en particular en el ovario (Tabla 2 y Fig.9).

Tabla 2.- Características de genes candidatos.			
Genes candidatos	Función	Implicación Biológica	Características
<i>Spt6</i>	Unión a cromatina	Transcripción bajo el promotor de la RNA polimerasa II	Dominio SH2-SH2
<i>CG33993</i>	Desconocida	Desconocida	Dominio SH2
<i>CG2887</i>	Unión a proteínas heat shock	Respuesta a calor	Dominios de regulación de DnaJ, implicada en migración de BCs
<i>CG1135</i>	Desconocida	Transición de fase G2 a M por daño a DNA	Forkhead-associated (FHA) domain
<i>coracle</i>	Proteína de unión al citoesqueleto	Desarrollo y regulación de órganos y tejidos en adulto.	Dominio PH
<i>vav</i>	GEF	Desarrollo embrionario, diferenciación neuronal, reorganización de citoesqueleto...	Dominio Dbl específico de RhoGTPasas. Dominio SH2, implicado en fosforilación.



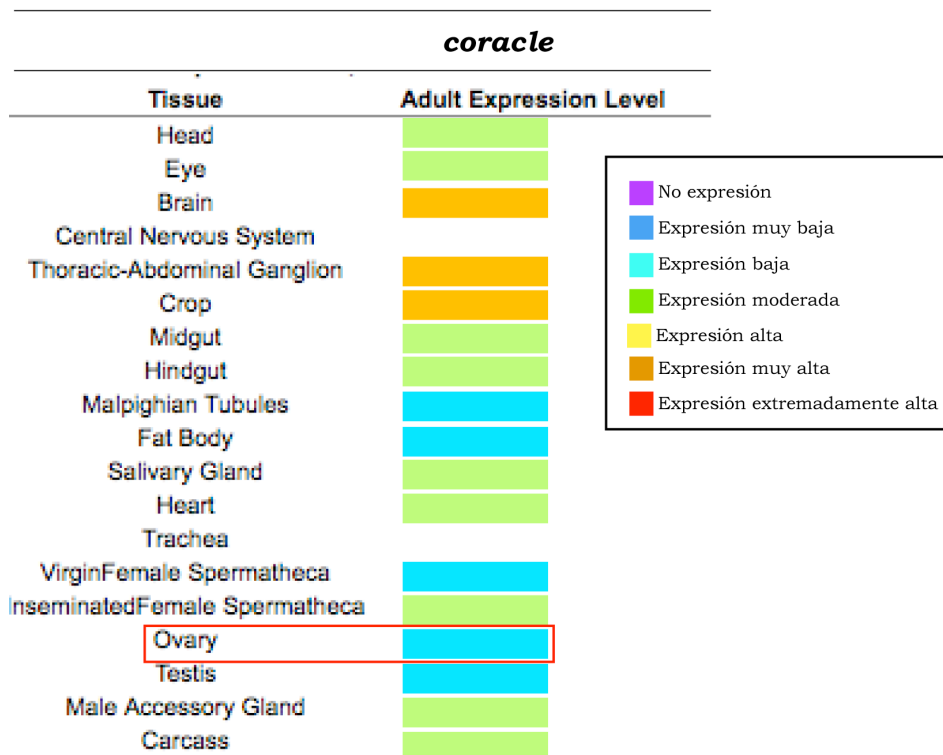
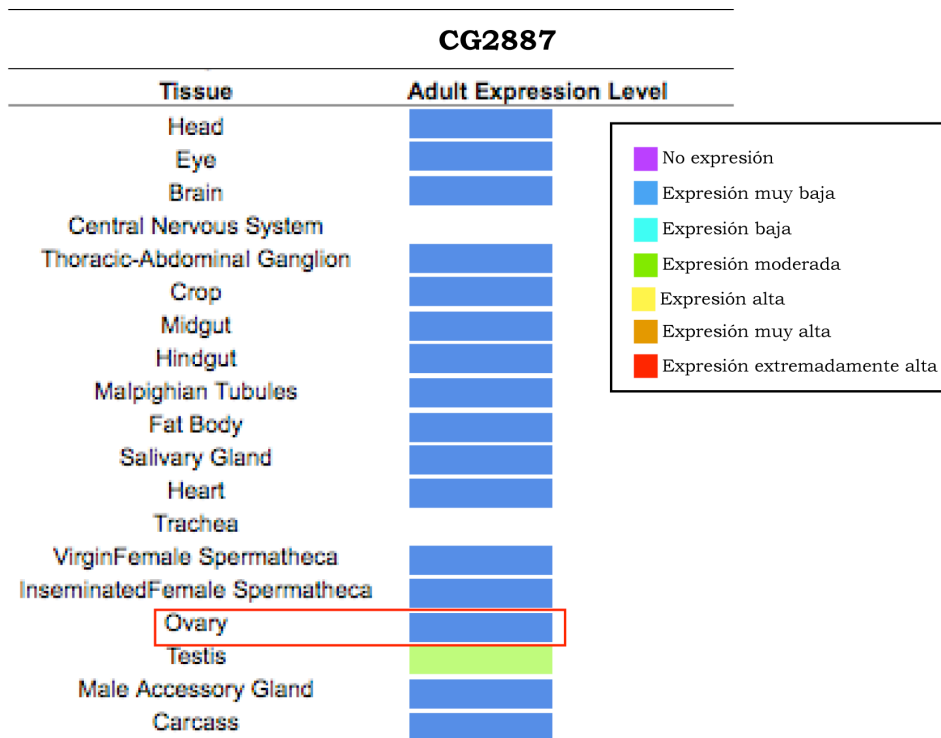




Figura 9.- Expresión de cada gen candidato en tejidos adultos de *Drosophila* extraído de FlyBase.

La expresión en ovarios está marcada con un cuadro rojo.

Estos datos indicaron que la proteína Spt6 es la que presenta mayores niveles de expresión en ovarios seguida de Vav y Coracle. En el caso de CG1135, no existía información disponible.

El siguiente paso fue analizar si la falta de función de estas proteínas en las BCs afectaba a su migración.

1.2 Estudio de los efectos de la disminución de los niveles de los genes candidatos en la migración de las BCs

Para realizar el estudio del papel de nuestros genes candidatos en la migración de las BCs, se decidió expresar RNA interferentes (RNAis) de

los diferentes genes específicamente en las BCs (ver Material y Métodos). Para expresar los RNAs se utilizó el sistema GAL4/UAS, usando las siguientes líneas GAL4: *slbo*-GAL4, la cual se expresa en las BCs, en las FCs posteriores y en las células centrípetas (Fig.10 A); *c306*-GAL4 que se expresa en las BCs y en algunas FCs posteriores (Fig.10 B); o una combinación de ambas. Para la visualización de las BCs se utilizó UASmoesin::GFP. Moesin es una proteína miembro de la familia ERM, la cual también incluye Ezrin y Radixin, que media la unión entre la membrana plasmática y el citoesqueleto de actina. Moesin se localiza en filopodios, lamelipodios y otras protrusiones celulares que se requieren tanto para el movimiento celular como para el reconocimiento célula-célula (revisado en Polesello and Payre, 2004).

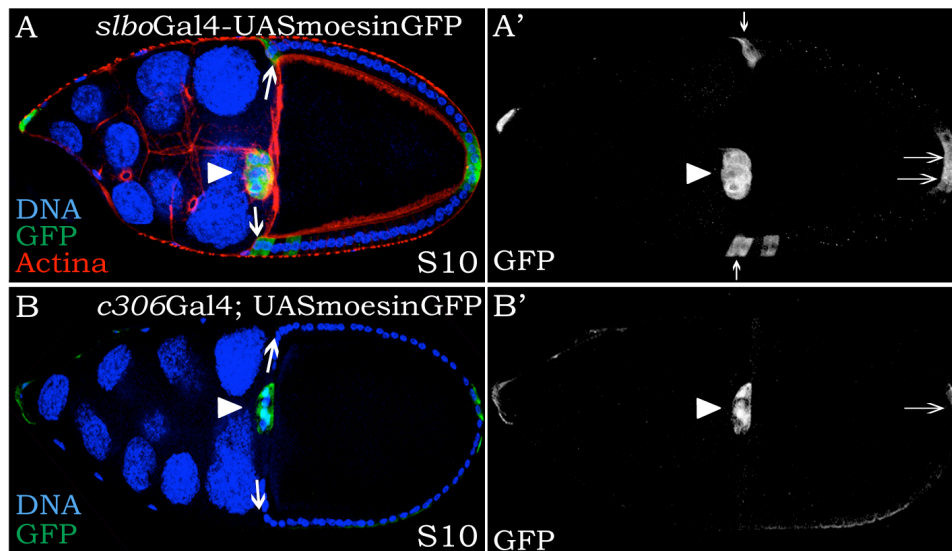


Figura 10.- Patrón de expresión de las líneas Gal4.

(A, B) Cámaras huevo de estadio 10 teñidas con anti-GFP (verde), rhodamine-phalloidin marcando la actina (rojo) y el marcador de DNA TO-PRO-3 (azul). (A) *slbo*.GAL4 dirige la expresión del marcador UAS-moeGFP en las BCs, FCs posteriores y células centrípetas. (B) *c306*.GAL4 dirige la expresión de UAS-GFP en BCs y FCs posteriores. (A', B') Canal del GFP. Las BCs quedan marcadas con puntas de flecha y las FCs y células centrípetas con flechas.

Como se ha mencionado en la introducción, las BCs constituyen un grupo de células foliculares que se delaminan de la parte anterior del epitelio folicular y migran de forma colectiva durante el estadio 9 hasta contactar con el oocito en el estadio 10 (ver Introducción). El grupo está formado por unas 4-6 células foliculares que durante el movimiento se sitúan en la periferia del grupo y 2 células polares situadas en el centro.

Para cuantificar los fenotipos de migración de las BCs se analizaron cámaras huevo de estadio 10, ya que en este estadio en una situación silvestre, las BCs han finalizado su migración y han contactado con la membrana anterior del oocito (Fig.10 A y B, puntas de flecha). Así mismo, en este estadio, el epitelio folicular ha retrocedido de tal manera que las células foliculares centrípetas cubren el oocito (Fig.10 A y B, flechas), lo que se usa como marca específica de estadio 10. En este estudio se utilizó el criterio estándar para cuantificar defectos en la migración de las BCs. Según este criterio, los fenotipos de migración se catalogan en función de la posición de las BCs en la región comprendida entre el extremo anterior del epitelio folicular y la membrana anterior del oocito en una cámara huevo de estadio 10. Así, se considera que no hay migración cuando las BCs no han abandonado el epitelio folicular y por lo tanto se hayan situadas en el extremo anterior de la cámara huevo, migración completa si se encuentran contactando con la membrana anterior del oocito, y migración $<50\%$ y $>50\%$ cuando las BCs han migrado menos o más de la mitad de la distancia hasta el oocito, respectivamente (Fig.11). Como control se utilizaron las líneas *slbo.GAL4-UAS.moesin::GFP* y *c306.GAL4; slbo.GAL4-UAS.moesin::GFP* que se comportan como silvestres ya que en estadio 10 el 100% de las BCs han alcanzado la membrana anterior del oocito (Fig.12 G).

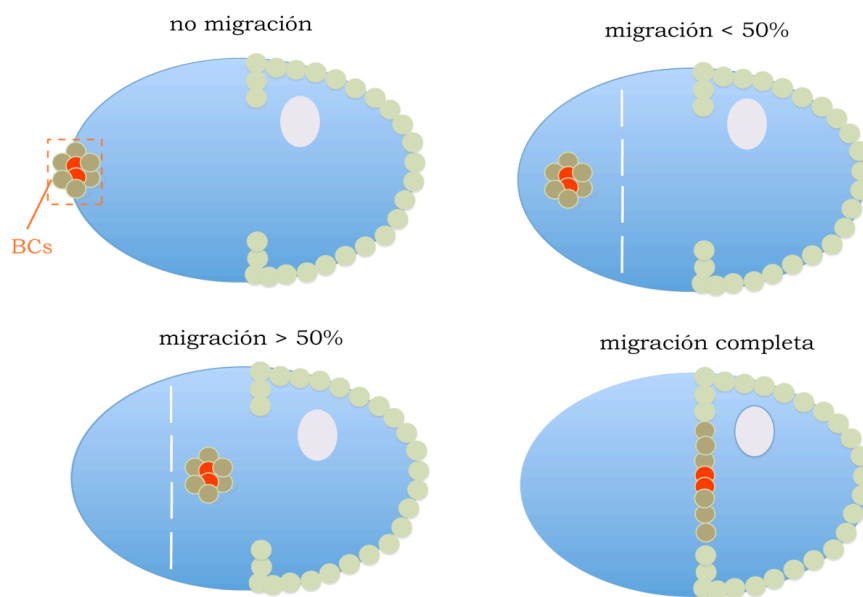


Figura 11.- Esquema del criterio de cuantificación de los fenotipos de migración de las BCs.

Teniendo en cuenta este criterio, se procedió a caracterizar los fenotipos de migración de las BCs en cámaras huevo que expresaban los RNAi para los distintos genes candidatos de manera específica en las BCs. Se analizaron entre 40 y 100 cámaras huevo de estadio 10 para cada RNAi y se obtuvo fenotipo de retraso de migración para los siguientes genes: *CG33993*, *CG2887*, *coracle* y *vav* (Fig.12). Curiosamente, la expresión del RNAi de *Spt6* no produjo ningún fenotipo de migración a pesar de que, según la información obtenida de la base de datos, es el que se expresa a niveles más altos en ovarios. Sin embargo, antes de concluir si *Spt6* se requiere o no en la migración de las BCs, habría que testar la efectividad del RNAi de *Spt6*. De igual modo, se debería testar el RNAi de *CG1135*.

A continuación se procedió a caracterizar el fenotipo de migración. Como se ha mencionado en la introducción la migración de las BCs, como cualquier migración celular, es un proceso multi-etapa que requiere de una reorganización del citoesqueleto de actina, de cambios en la adhesión celular y de una redistribución de la polaridad celular. Por ello, en el siguiente paso se decidió analizar cuál de estos tres aspectos importantes se veían afectados cuando se disminuían los niveles de los genes candidatos en las BCs. Así, se analizó:

A) la reorganización del citoesqueleto de actina, mediante tinción con rhodamine-phalloidin,

B) los cambios en la adhesión celular, mediante tinción con DE-cadherina y

C) los cambios en la polaridad celular, mediante el análisis de la localización de la proteína de polaridad Dlg.

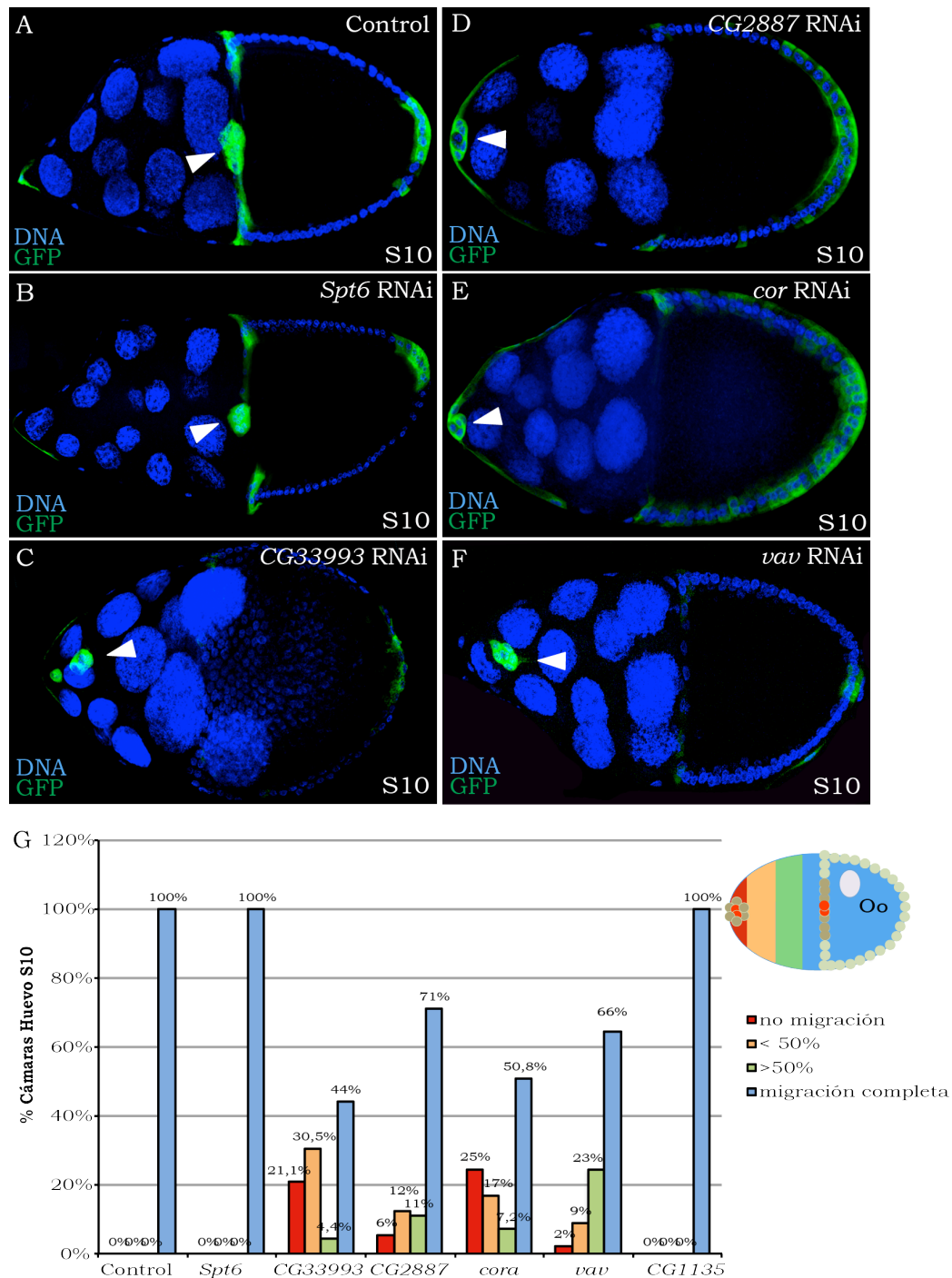


Figura 12.- Análisis del fenotipo de los RNAis de los genes.

(A-F) Panel de cámaras huevo S10 control (A), *Spt6* RNAi (B), *CG33993* RNAi (C), *CG2887* RNAi (D), *cor* RNAi (E) y *vav* RNAi (F). En todos los casos el DNA está marcado con TO-PRO-3 (azul), la actina con rhodamine-phalloidin (rojo) y la expresión de Slbo con GFP (verde). G) Cuantificación del fenotipo de migración.

Como se observa en la gráfica de la Fig.12 G, la expresión de los RNAis de la mayoría de los genes candidatos producía una variedad de defectos en la migración de las BCs que iban desde la inhibición total a

una migración normal. Esto ocurre con muchos de los genes implicados en la migración de las BCs y se podría deber al hecho de que el uso del RNAi no produce una bajada equitativa de expresión en todas las células del grupo. Alternativamente, podría reflejar una redundancia entre los genes que regulan este proceso. En cualquier caso, para analizar en más profundidad los defectos que la bajada de niveles de un determinado gen candidato produce en la migración celular, decidimos concentrarnos en aquellos casos en los cuales las BCs mutantes ya se habían alejado del epitelio folicular, ya que se ha visto que la falta de delaminación puede afectar de manera indirecta a la expresión y/o distribución de los niveles de actina, DE-cadherina y Dlg.

1.2.1. Caracterización de los genes candidatos.

1.2.1.1 Coracle

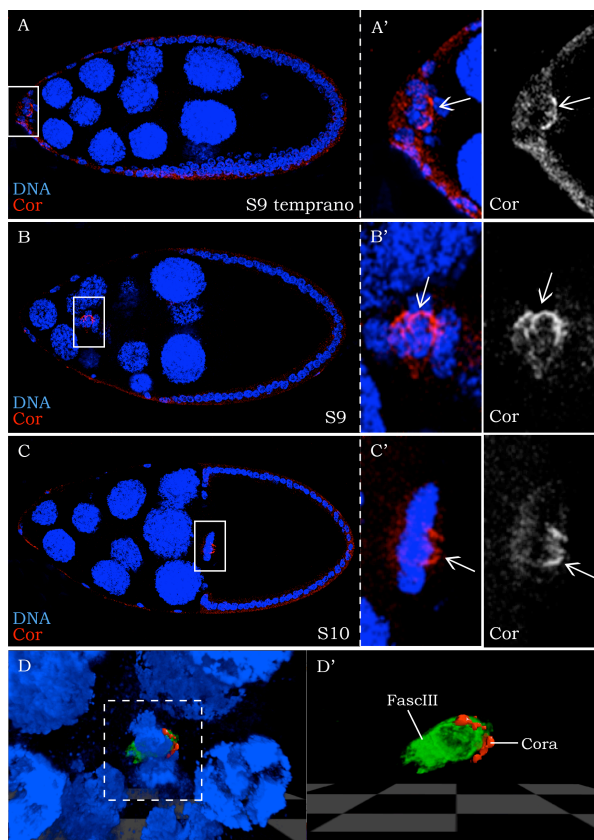
Coracle es el homólogo en *Drosophila* de la proteína 4.1 de mamíferos. La proteína 4.1 humana fue identificada originalmente como un componente mayoritario del citoesqueleto de los eritrocitos (Marchesi, 1985). Estudios bioquímicos han sugerido que esta proteína conecta el citoesqueleto subcortical con lípidos y receptores transmembrana a través de su dominio FERM (Marchesi et al., 1985). Asimismo, estudios recientes en cultivos celulares de mamíferos han determinado que la proteína 4.1R se localiza en el frente de migración y es clave para el establecimiento de la polaridad en células migratorias (Ruiz-Sáenz et al., 2011). En *Drosophila*, Coracle se ha implicado en la determinación de la polaridad apico-basal de algunos epitelios durante el desarrollo embrionario e imaginal (Fehon et al., 1994). Debido a que para promover la migración celular en general y de las BCs en particular es necesario el establecimiento de una polaridad, decidimos analizar el papel de Coracle en las BCs.

- **Localización de la proteína Coracle, el homólogo de *Drosophila* de Protein 4.1, durante la migración de las BCs.**

Para analizar el patrón y la dinámica de expresión de Coracle durante la migración de las BCs, se usó el anticuerpo comercial frente a Coracle. Se observó que Coracle se localizaba en las PCs durante todo el proceso de migración de las BCs, desde el estadio 8 hasta el 10 (Fig.13 A-C y A'-C').

Para comprobar que Coracle se expresaba específicamente en las PCs, se decidió visualizarlas utilizando el marcador de células polares, el gen Fasciclin III (FasIII) (Brower et al., 1981; Ruohola et al., 1991). Para visualizar la expresión de FasIII, se usó una línea de moscas que portaban un elemento P que contiene la proteína de fluorescencia GFP insertado en la zona reguladora del gen *fascIII*, FasIII-GFP, y que mimetiza su patrón de expresión endógeno. (Fig.13). Cuando teñimos con anti-Coracle y anti-GFP cámaras hueco que llevaban FasIII-GFP, se observó que Coracle y FasIII co-localizaban en las mismas células, lo que corroboraba que Coracle se expresaba específicamente en las PCs. Mediante el análisis de una imagen en 3 dimensiones se observó que mientras que FasIII parecía decorar toda la membrana de las PCs, la expresión de Coracle estaba restringida a una región de éstas (Fig.13 D y D'). Coracle se expresa en la mayoría de los epitelios en *Drosophila*, localizándose en las uniones del septo que se posicionan en la región subapical de las células, por lo que tampoco decora toda la membrana celular sino que se restringe su expresión a la posición apico-lateral (Woods et al., 1997; Ward et al., 2001; Laprise et al., 2009). Sería interesante comprobar si en el caso de las PCs, Coracle también se asocia a estas uniones.

Figura 13.- Coracle se localiza en las PCs. (A-C) Imágenes confocal mostrando cámaras huevo silvestres de S9 temprano (A), S9 (B) y S10 (D). El DNA está marcado con TO-PRO-3 en azul y anti-Coracle en verde (flechas). (A'-C') Magnificación de la región que aparecen en el recuadro en blanco en A-C. Coracle se encuentra localizada en las PCs antes y durante la migración de las BCs. (D) Imagen 3D del grupo de las BCs durante la migración en el que las PCs están marcadas con anti-FasIII en verde y se muestra la expresión de Coracle con anti-Cora en rojo. (D') Magnificación de la región encuadrada en D donde sólo se muestran los canales rojo y verde.

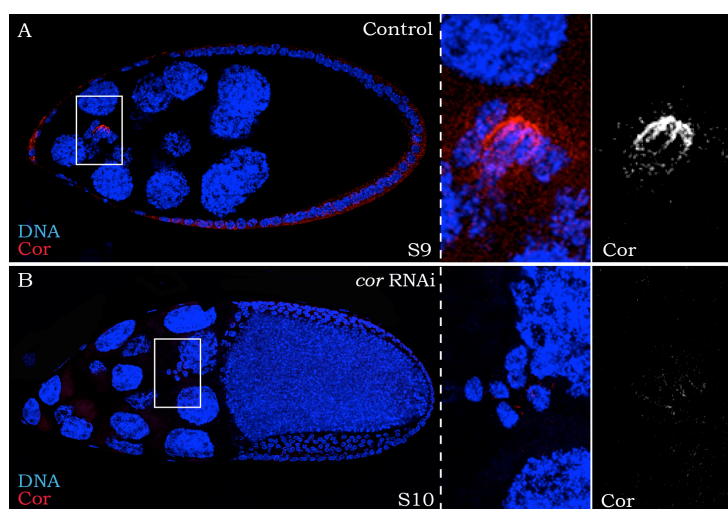


- **Caracterización del papel de Coracle durante la migración de las BCs**

Ya que se disponía de un anticuerpo contra Coracle, se decidió testar la eficacia del uso del RNAi. Se observó que la expresión del RNAi de *coracle* en BCs resultaba en una drástica disminución de los niveles de Coracle (Fig.14 A y B).

Figura 14.- Expresión de *coracle* en cámaras huevo que expresan *coraRNAi*.

Cámaras huevo control (A) y expresando *coraRNAi* (B) teñidas con el anticuerpo anti-cora (rojo) y un marcador nuclear TO-PRO-3 (azul). Podemos observar que la expresión de *coraRNAi* en las BCs reduce drásticamente los niveles de Coracle.



Una vez comprobada la eficiencia del RNAi, se analizaron las consecuencias que tenía la disminución de *coracle* en la reorganización del citoesqueleto de actina y en adhesión y polaridad celular.

A) Reorganización del citoesqueleto de actina.

Se observó que si bien en la situación control la actina se acumulaba a mayores niveles en el frente de migración, esto no ocurría en aquellos grupos de BCs que expresaban el RNAi de *coracle* (Fig.15 A y B).

B) Adhesión celular.

Como se ha mencionado en la introducción otra proteína implicada en migración de las BCs es la *DE*-cadherina. Para analizar el efecto de la bajada de niveles de *coracle* sobre los niveles y/o localización de las cadherinas, se tiñó con el anticuerpo anti-*DE*-cadherina cámaras huevo que expresan el RNAi de *coracle* en las BCs. En una situación silvestre, la expresión de *DE*-cadherina durante la migración de las BCs es baja entre las células del borde y las células nutricias y alta entre las células del borde y las células polares, así como entre las células polares (Fig.6 B). Este patrón de expresión se mantenía inalterado en BCs que expresaban el RNAi de *coracle* (Fig.15 C y D).

C) Polaridad celular

Por último se analizó si *coracle* podría estar regulando polaridad celular durante la migración de las BCs, ya que en previos estudios se había observado que *coracle* participaba en el mantenimiento de la polaridad de algunos epitelios durante estadios embrionarios de *Drosophila* (Fehon et al., 1994; Laprise et al., 2009). Para ello se analizó el patrón de expresión de Discs large (Dlg), una proteína de polaridad celular relacionada con Coracle. De hecho, estudios previos han mostrado que la falta de Dlg en discos imaginales y en algunos epitelios de larva de *Drosophila* generaba una disrupción de la expresión de Coracle (Woods et al., 1996).

El patrón de expresión de Dlg en BCs es dinámico. Así mientras que durante el estadio 8, antes de la migración, se acumula preferencialmente en las células polares en la zona de contacto con la línea germinal, durante la migración se acumula en todas las células del grupo en la región de contacto entre ellas (Goode and Perrimon, 1997; Szafranski and Goode, 2004; Fig.15 E), Este patrón de expresión no variaba en BCs que expresaban el RNAi de *coracle* (Fig.15 F).

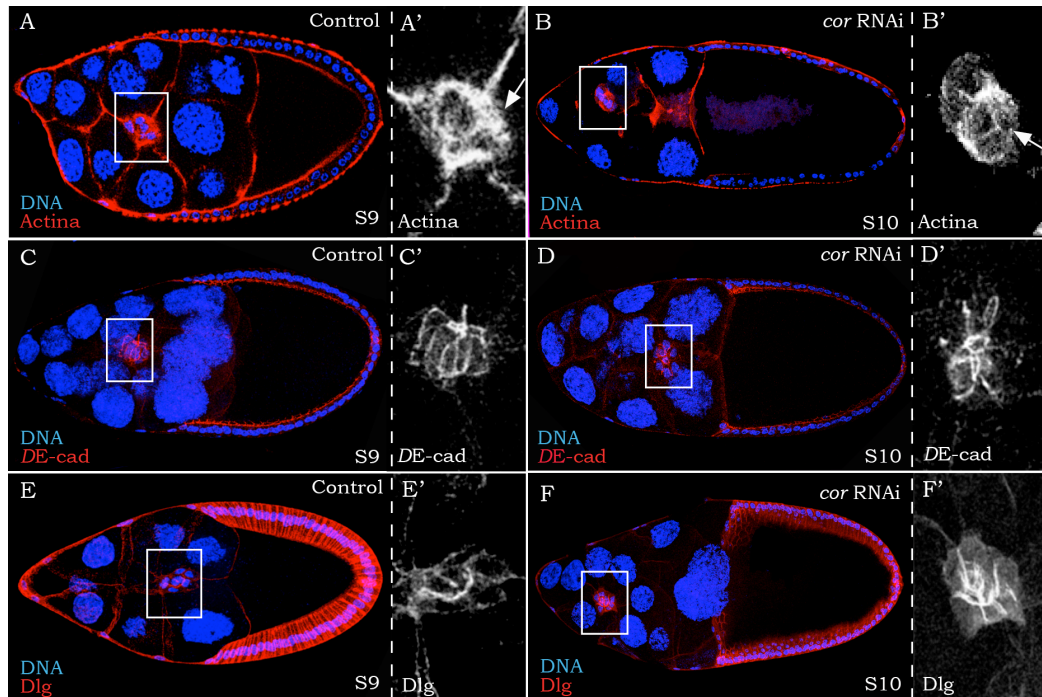


Figura 15.- Expresión de la actina, cadherina y Disc large en BCs que expresan *cor*RNAi.

Imágenes confocal de cámaras huevo control (A, C y E), y de cámaras huevo que expresan *cor*RNAi (B, D y F). En todos los casos las cámaras huevo están marcados con el marcador nuclear TO-PRO-3 (azul). A su vez las cámaras huevos se han teñido con: A, B rhodamine-phalloidin que marca la actina (rojo). C, D anti-DEcad (rojo) y E, F anti-Dlg (rojo). (A) Observamos que, si bien los niveles de actina disminuyen en la situación experimental respecto a la control (A, B), los niveles de DE-cadherina (C, D) y de Dlg no varían (E, F). (A'-F') Magnificación de las BCs.

Todos estos resultados sugieren que el gen *coracle* se requiere para la correcta migración de las BCs y que probablemente su función sea la de regular el citoesqueleto de actina, mientras que no parece jugar un papel fundamental en la regulación de la adhesión ni de la polaridad celular.

1.2.1.2 CG2887

Como se muestra en la figura 12D, la expresión del RNAi frente al gen CG2887 en las BCs producía un retraso en la migración en un 29% de los casos analizados (Fig.12 G).

Para caracterizar en más detalle el fenotipo de retraso en la migración, se decidió analizar los posibles cambios en los niveles de expresión y distribución de actina, cadherina y Dlg como se hizo en el caso anterior.

A) Reorganización del citoesqueleto de actina.

Se observó que la expresión del RNAi de CG2887 en BCs producía una disminución generalizada de los niveles de actina (Fig.16 A y B).

B) Adhesión celular.

Sin embargo, la disminución de la expresión de CG2887 no afectaba a los niveles de DE-cadherina en las BCs (Fig.16 C y D).

C) Polaridad celular.

Por último, se observó que la disminución de los niveles de CG2887 en las BCs producía una disminución drástica de los niveles de Dlg (Fig.16 E y F).

Estos resultados sugieren que el gen CG2887 se requiere para la correcta migración de las BCs y que su función podría estar implicada en la regulación del citoesqueleto de actina y de la polaridad celular. Sin embargo, no parece tener ningún papel crucial en la regulación de la adhesión celular.

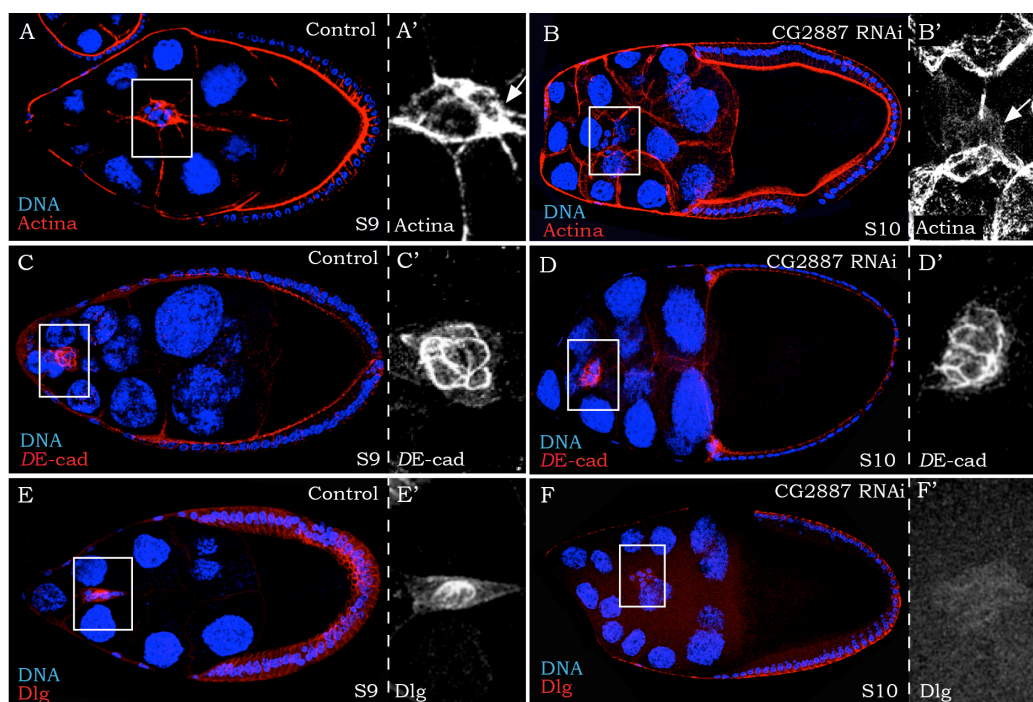


Figura 16.- Expresión de la actina, cadherina y Disc large en BCs que expresan CG2887RNAi.

Imágenes confocal de cámaras huevo control (A, C y E), y de cámaras huevo que expresan CG2887RNAi (B, D y F). En todos los casos las cámaras huevo están marcados con el marcador nuclear TO-PRO-3 (azul). A su vez las cámaras huevos se han teñido con: A, B rhodamine-phalloidin que marca la actina (rojo). C, D anti-DEcad (rojo) y E, F anti-Dlg (rojo). (A) Observamos que tanto los niveles de actina (A, B) como los de Dlg (E, F) disminuyen en la situación experimental respecto a la control (A, B). Sin embargo, los niveles de DE-cadherina (C, D) no varían. (A'-F') Magnificación de las BCs.

1.2.1.3 CG33993

CG33993 es otro de nuestros candidatos de los cuales no se tiene constancia de su implicación en migración celular. Sin embargo, nosotros mostramos que una reducción de su expresión en BCs afectaba a la capacidad migratoria de las mismas, de manera que en el 56% de los casos analizados se observó un retraso (Fig.12 G). En un estudio más detallado del fenotipo encontramos lo siguiente:

A) Reorganización del citoesqueleto de actina.

Al igual que en casos anteriores, la expresión del RNAi de CG33993 en BCs resultaba en una disminución de los niveles de actina. De hecho, fue el caso en el cual la reducción de la expresión de actina era más drástica (Fig.17 B).

B) Adhesión.

La expresión del RNAi de *CG33993* no producía ningún cambio en la expresión o distribución de los niveles de *DE-cadherina* (Fig.17 D y F).

C) Polaridad celular.

Sin embargo, se observó que cuando se disminuían los niveles de *CG33993* en las BCs, se producía un ligero descenso en los niveles de *Dlg*, aunque su distribución era la misma que en la situación control.

Estos resultados sugieren que el gen *CG33993*, al igual que el gen *CG2887*, podría controlar la migración de las BCs a través de una regulación de los niveles y/o distribución de actina y de la proteína de polaridad *Dlg*.

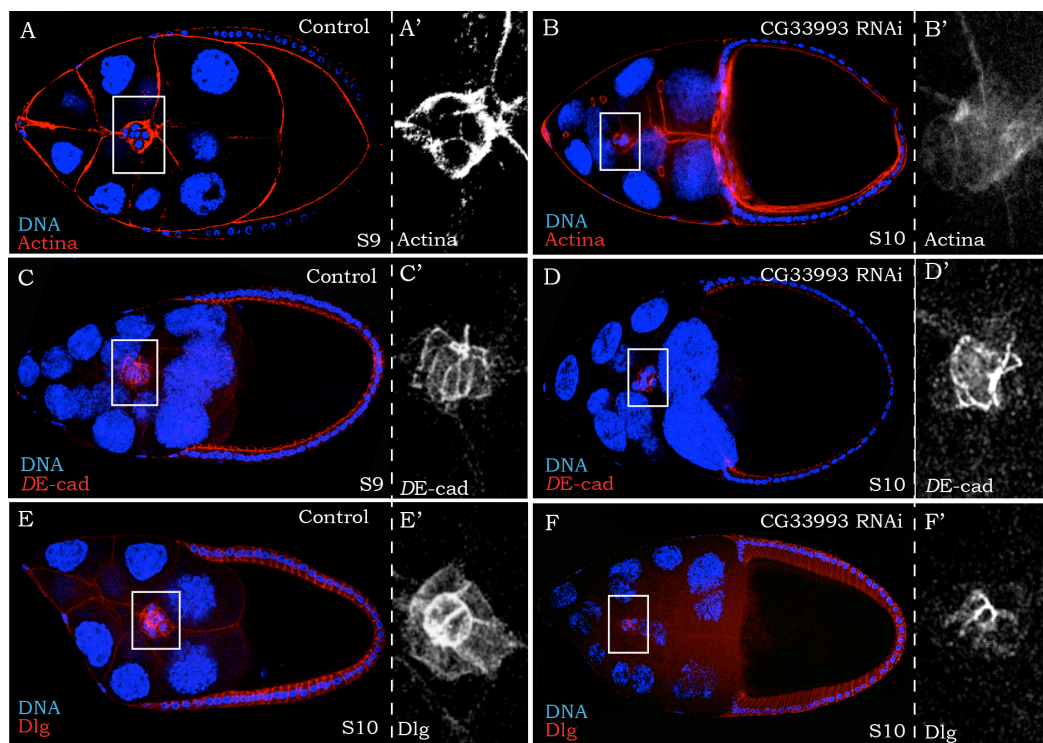


Figura 17.- Expresión de la actina, cadherina y Disc large en BCs que expresan *CG33993RNAi*.

Imágenes confocal de cámaras huevo control (A, C y E), y de cámaras huevo que expresan *CG33993RNAi* (B, D y F). En todos los casos las cámaras huevo están marcadas con el marcador nuclear TO-PRO-3 (azul). A su vez las cámaras huevos se han teñido con: A, B rhodamine-phalloidin que marca la actina (rojo). C, D anti-*DEcad* (rojo) y E, F anti-*Dlg* (rojo). (A) Observamos que tanto los niveles de actina (A, B) como los de *Dlg* (E, F) disminuyen en la situación experimental respecto a la control (A, B). Sin embargo, los niveles de *DE-cadherina* (C, D) no varían. (A'-F') Magnificación de las BCs.

1.2.2. Vav

El último de los candidatos a analizar fue Vav. Como se ha mencionado en la introducción, las proteínas pertenecientes a la familia Vav son un grupo de moléculas de señalización involucradas en la dinámica del citoesqueleto de actina y en oncogénesis (Bustelo, 2000a). La principal actividad biológica de estas proteínas es actuar como factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) de algunos miembros de la familia Rho/Rac activándolas (Movilla and Bustelo, 1999). Por ello, las proteínas de la familia Vav se han involucrado en muchos procesos biológicos donde se requiere la actividad de los miembros de la familia Rho/Rac, como proliferación y migración celular. Sin embargo, ya que la mayoría de estos estudios se han realizado en cultivos celulares, poco se sabe del papel de las proteínas Vav en procesos biológicos en el contexto de organismos en desarrollo.

La expresión del RNAi de *vav* específicamente en las BCs afectaba a su migración en el 34% de los casos analizados (Fig.12 G). Cuando se analizó en más profundidad este fenotipo, se encontró lo siguiente:

A) Reorganización del citoesqueleto.

La expresión del RNAi de *vav* en BCs resultaba en una disminución en los niveles de actina preferencialmente en el frente de migración (Fig.18 A y B).

B) Adhesión celular.

Observamos que la deficiencia de Vav no afectaba a la expresión de DE-cadherina (Fig.18 C y D).

D) Polaridad celular.

De la misma manera, no se observó ningún efecto en los niveles o distribución deDlg cuando se disminuyeron los niveles de Vav en las BCs (datos no mostrados).

Estos resultados sugieren que la función de Vav en la migración de las BCs es principalmente la de regular el citoesqueleto de actina.

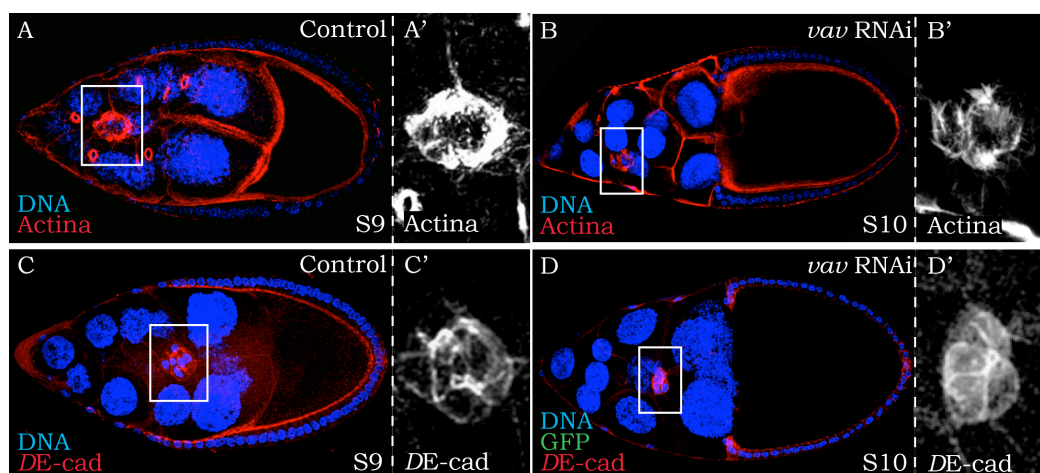


Figura 18.- Panel de la tinción de actina y DE-cadherina en BCs que expresan *vav*RNAi.

Imágenes confocal de cámaras huevo control (A y C), y de cámaras huevo que expresan *vav*RNAi (B y D). En todos los casos las cámaras huevo están marcados con el marcador nuclear TO-PRO-3 (azul). A su vez las cámaras huevos se han teñido con: A, B rhodamine-phalloidin que marca la actina (rojo). C, D anti-DEcad (rojo) y E, F anti-Dlg (rojo). (A, B) Observamos que mientras que los niveles y/o distribución de actina disminuyen en la situación experimental respecto a la control, los niveles de DE-cadherina (C, D) no varían. (A'-D') Magnificación de las BCs.

En resumen todos los candidatos analizados parecían ser requeridos en las BCs para su correcta migración. No obstante para poder obtener conclusiones más definitivas, se deberían analizar los fenotipos en un contexto de falta total de función de los genes candidatos, ya que en la mayoría de los casos no sabíamos en que medida la expresión de los RNAis eliminaba la función del gen. Como este análisis no iba a ser posible dentro del marco temporal de esta tesis, se decidió escoger un gen en particular. De entre todos los candidatos, Vav nos pareció el más interesante por las siguientes razones:

1. Experimentos con células en cultivos ya habían implicado a Vav en migración celular.
2. Y se había demostrado que en algunos contextos celulares Vav actuaba de enlace entre los RTKs y el citoesqueleto de actina.

Esto hacía de Vav un candidato ideal para actuar corriente abajo de los RTKs durante el proceso de la migración de las BCs. Por ello, en el resto del trabajo de tesis, decidimos analizar en profundidad los mecanismos moleculares y celulares por los cuales Vav regulaba la migración de las BCs.

2 EL GEF *vav* EN LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS DEL BORDE.

Los resultados que se han mostrado hasta ahora indican que Vav está implicada en la migración de las BCs. En el resto de este trabajo se analizarán los mecanismos moleculares y celulares mediante los cuales Vav ejerce esta función.

2.1 Caracterización del papel de Vav en las BCs.

2.1.1. Vav se requiere para la migración de las BCs.

En el apartado anterior se ha demostrado que la expresión del RNAi de *vav* en BCs afectaba a su migración aunque no la inhibía totalmente. Esto se podría deber al hecho de que la expresión del RNAi de *vav* no resultaba en una eliminación total de la proteína. Ya que no se disponía de un anticuerpo comercial que funcionase en inmunohistoquímica en ovarios, no se pudo testar si este era el caso. Por lo tanto, se decidió analizar el fenotipo de la eliminación total de Vav en BCs generando BCs mutantes para un alelo nulo de *vav*. Para eliminar el gen *vav* en las BCs, se utilizó el sistema FLP/FRT. Este sistema permite, gracias a la activación de una enzima flipasa (FLP), que se produzcan eventos de recombinación mitótica entre las regiones FRT de cromátidas hermanas. Cuando una de las cromátidas lleva un alelo nulo del gen *vav* y la otra el gen que codifica para la proteína fluorescente GFP, tras producirse la recombinación mitótica se obtienen cámaras huevo mosaico que contienen células mutantes homocigóticas para el gen *vav* (GFP-/-), células mutantes heterocigóticas para *vav* (GFP+/-) y células homocigóticas para el gen que codifica la proteína GFP (GFP+/+) que actúan como silvestres (ver Material y Métodos y Fig.19). El alelo nulo de *vav* que se usó en este estudio fue el *vav*²⁵ (Malartre et al., 2010). Para producir la recombinación mitótica se activó la flipasa de dos maneras:

- 1.-** Con el sistema GAL4/UAS utilizando una línea GAL4 que se expresa de manera temprana en la mayoría de las FCs incluyendo las BCs, e22-GAL4, recombinada con UAS.Flipasa (UAS.FLP).
- 2.-** Mediante choque térmico utilizando hs-flp, activando la flipasa en las FCs al azar (ver Material y Métodos).

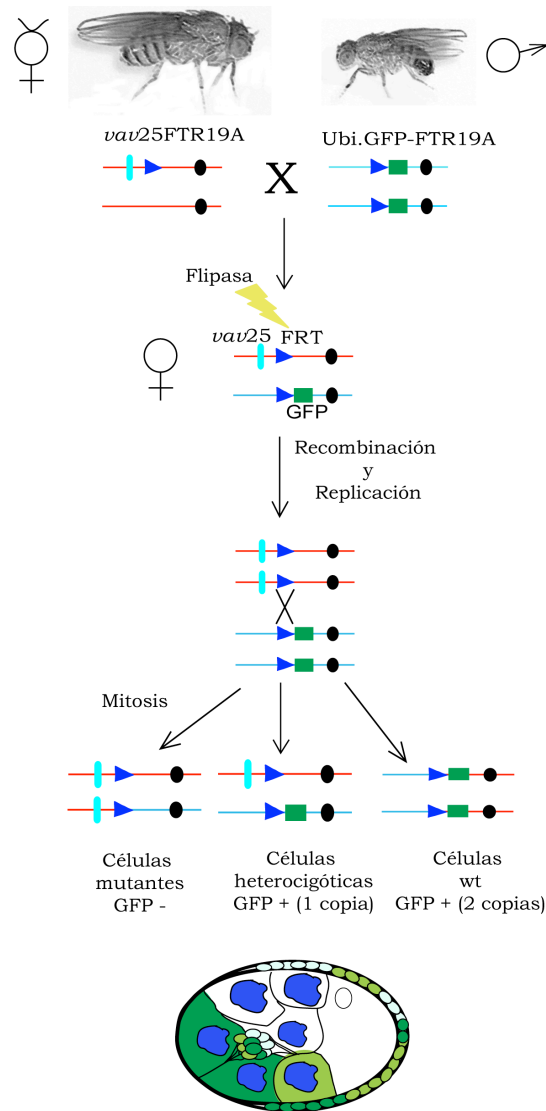


Figura 19.- Esquema de la generación de clones mediante el sistema FLP/FRT.

Teniendo en cuenta el criterio estándar de cuantificación del fenotipo de migración, se procedió a caracterizar los fenotipos de migración de cámaras huevo que portan BCs mutantes para *vav*²⁵.

Como se ha indicado anteriormente, el sistema FLP/FRT tiene la propiedad de generar mosaicos, lo que implica que cada cámara huevo tendrá un número diferente de BCs silvestres respecto a BCs mutantes. En la cuantificación de los fenotipos de migración se observó que no se producía retraso en la migración de las BCs cuando el número de células mutantes era inferior a 3, por lo que se decidió cuantificar aquellas cámaras huevo que tenían 3 o más células mutantes. De este

modo se observó que en un 8% de las cámaras huevo analizadas las BCs migraban menos del 50%, en un 69% migraban más del 50% y en un 23% de los casos la migración era completa (Fig.20 E y G). También se observó que incluso en aquellos casos en los que todas las BCs eran mutantes para *vav*, lo que era muy difícil de obtener (n=10), el fenotipo era muy parecido al obtenido cuando se expresaba el RNAi de *vav* (Fig.20 F). Esto sugiere que el fenotipo obtenido con *vav*RNAi no era debido a una presencia residual de la proteína Vav sino que mostraba el requerimiento real de Vav.

Estos resultados demuestran que si bien Vav se requiere para la correcta migración de las BCs, su función no es totalmente esencial, ya que algunos grupos de BCs que carecen de Vav pueden llegar a migrar. Este es también el caso de PVR y EGFR, ya que la eliminación de cualquiera de ellos en las BCs no bloquea totalmente su migración.

Ya que el fenotipo obtenido a partir de la falta de función de *vav* era muy similar al obtenido a partir de la expresión del RNAi y debido a la dificultad para la obtención de clones mutantes, en la mayoría de este estudio se utilizó el RNAi de *vav*.

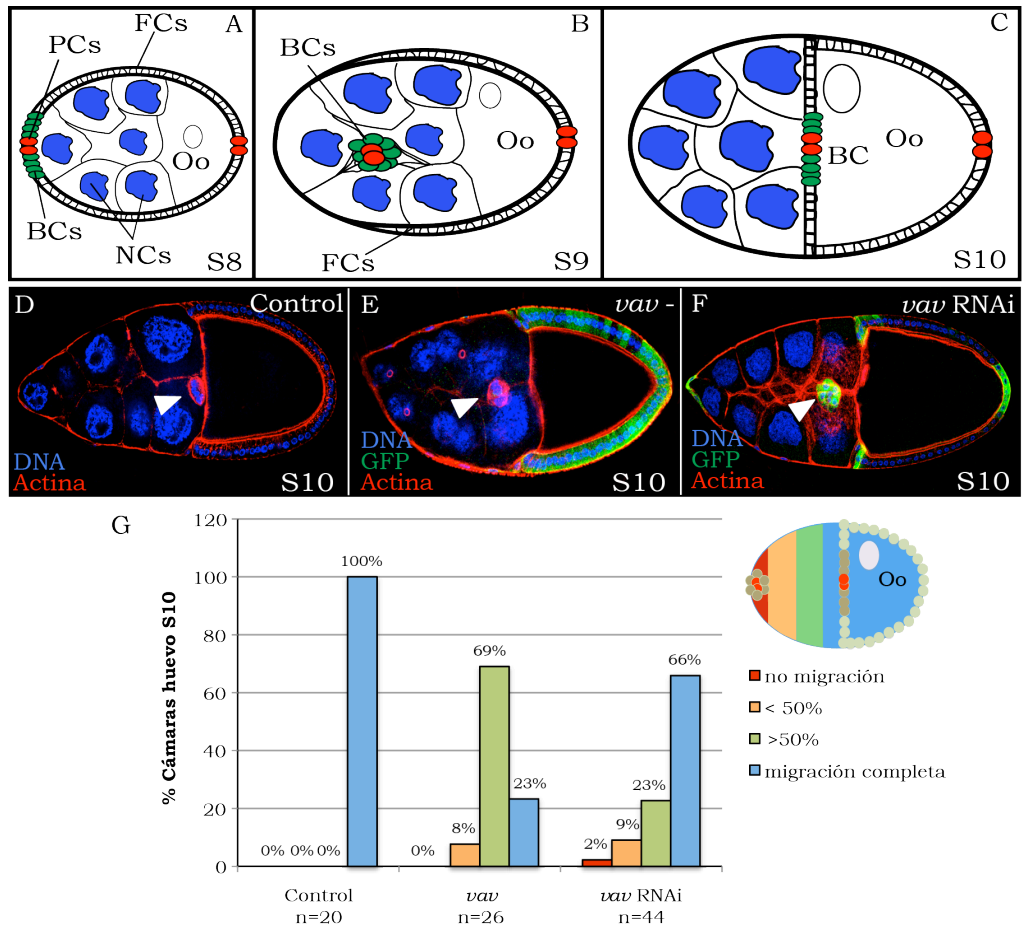


Figura 20.- Vav se requiere en la migración de las BCs.

(A-C) Diagrama esquemático de cámaras huevo desde el estadio 8 al 10 (S8-S10). Se muestran las células nutricias (NCs), oocito (Oo) y células foliculares (FCs). Las células polares (PCs) se muestran en rojo y las células del borde (BCs) en verde. (D) Cámara huevo silvestre, (E y F) cámaras huevo mutantes para *vav*. En todos los casos las cámaras huevo están marcadas con, anti-GFP (verde), un marcador nuclear TO-PRO-3 (azul) y rhodamine-phalloidin (rojo). (D) En una cámara huevo control de estadio 10 las BCs (punta de flecha) han migrado hasta contactar con el oocito. (E) Cámara huevo mosaico en estadio 10, conteniendo todas las BCs mutantes (células GFP -) para *vav*. (F) Cámara huevo en estadio 10 expresando *vav*RNAi en las BCs. En ambos casos, las BCs presentan un retraso en la migración. (G) Cuantificación del fenotipo de migración de las BCs en cámaras huevo de S10.

2.1.2 Vav se localiza en las BCs antes y durante la migración.

Tras obtener un fenotipo de migración de las BCs debido a una disminución de la función de Vav, se decidió analizar el patrón de expresión de Vav durante la migración. Ya que no se disponía de un anticuerpo, se decidió expresar una proteína quimérica para Vav que contenía el cDNA de Vav y un epítipo HA en su extremo carboxi-terminal, que denominaremos Vav wt-HA, que permitía detectar la expresión de esta proteína (Couceiro et al., 2005). Se sabe que esta proteína quimérica es capaz de rescatar la función de Vav, lo que implica que es funcional y que en principio debería localizarse a nivel celular de manera similar a la proteína endógena (Malartre et al., 2010).

En cualquier caso, primero se testó que la expresión de la proteína quimérica Vav wt-HA en las BCs no afectase a su migración. Tras observar que las BCs que expresan Vav wt-HA se comportaban como las silvestres, se analizó la localización de Vav mediante el uso de un anticuerpo frente al epítipo HA. Se observó que en el estadio 8, cuando el grupo de las BCs aún no se había delaminado del epitelio folicular, Vav wt-HA se localizaba en el citoplasma de dichas células de manera más o menos uniforme (Fig.21 A). Si embargo, durante la migración, en un estadio 9, Vav wt-HA se acumulaba preferentemente en las proyecciones emitidas por las BCs (Fig.21 B). Finalmente, en un estadio 10, cuando las BCs ya estaban contactando con el oocito, Vav wt-HA desaparecía prácticamente del grupo (Fig.21 C).

En resumen, los datos obtenidos del estudio de la localización celular de Vav demuestran que Vav se localiza preferentemente en las proyecciones de las BCs y que su localización parece estar regulada durante las distintas fases de la migración. Por ello, el siguiente paso fue analizar si Vav se requería para la formación, estabilización y/o dinámica de las proyecciones de las BCs durante su migración.

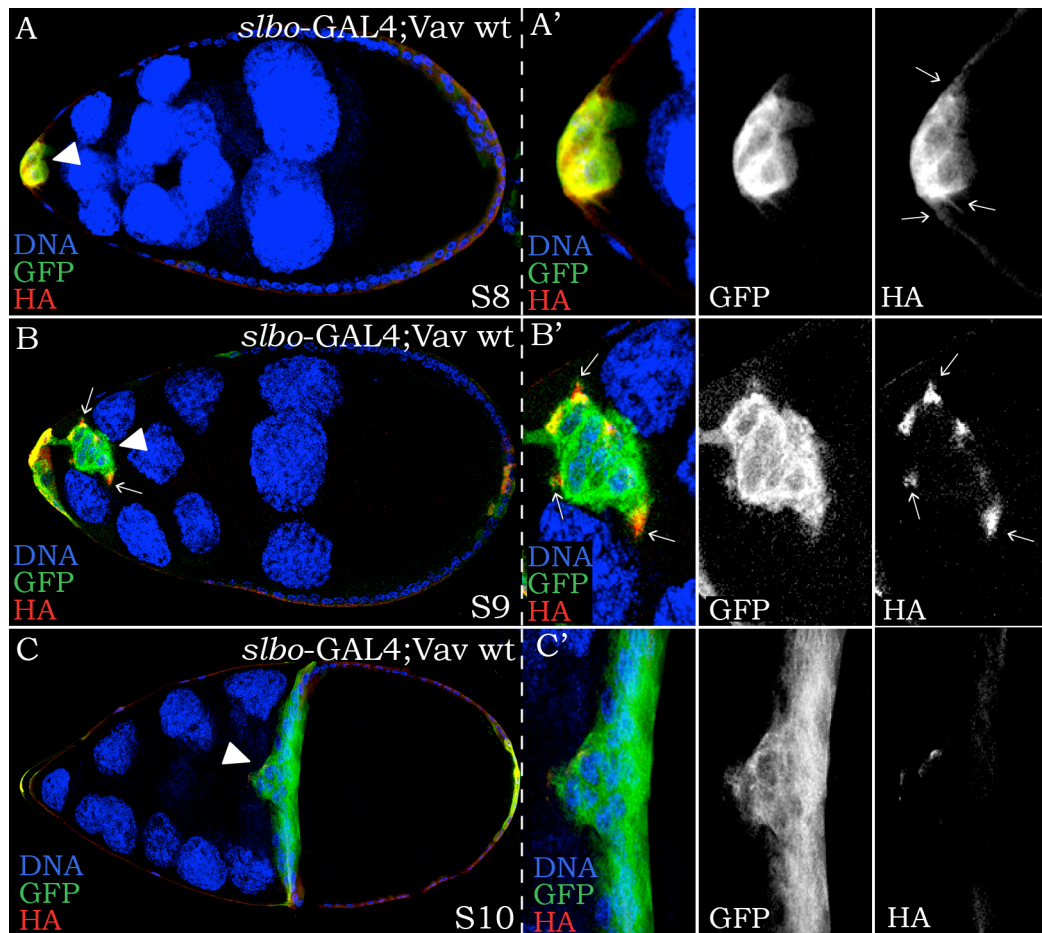


Figura 21.- Localización de Vav en las BCs.

(A, B y C) Estadios 9 y 10 de cámaras huevo donde se expresa Vav wt-HA. En todos los casos, los cámaras huevo están marcados con, anti-GFP (verde), un marcador nuclear TO-PRO-3 (azul) y anti-HA (rojo). (A) Durante S8, Vav wt-HA (canal HA) se localiza de forma ubicua en el citoplasma de las BCs (punta de flecha) y en las proyecciones (flechas). (B) En S9 Vav se localiza en las proyecciones (flechas) de las BCs. (C) Finalmente en S10 desaparece la expresión de Vav. (A', B' y C') Magnificación de las BCs.

2.1.3 Vav se requiere para la formación y distribución de las proyecciones durante la migración de las BCs.

Estudios de la dinámica de las protrusiones de las BCs han demostrado que en una situación silvestre, las proyecciones son emitidas preferentemente en el frente de migración donde además son más abundantes y más estables que en la parte opuesta (Poukkula et al., 2011; Fig.24 A). Ya que Vav parece acumularse de manera preferente en las proyecciones, se decidió estudiar si jugaba algún papel en la dinámica de las mismas. Para ello se comparó, mediante análisis *in vivo*,

la dinámica de las proyecciones durante la migración en BCs control y BCs que expresaban el RNAi de *vav*. El análisis *in vivo* permitió analizar la dinámica de las proyecciones a medida que las BCs se movían hacia el oocito (Fig.22 A) (ver Material y Métodos). Este análisis se realizó en cámaras huevo donde las BCs mutantes habían logrado delaminarse del epitelio anterior y mostraban un fenotipo de migración, ya que en los casos en los que no se delaminaban no se visualizaban bien las proyecciones (Fig.22 B).

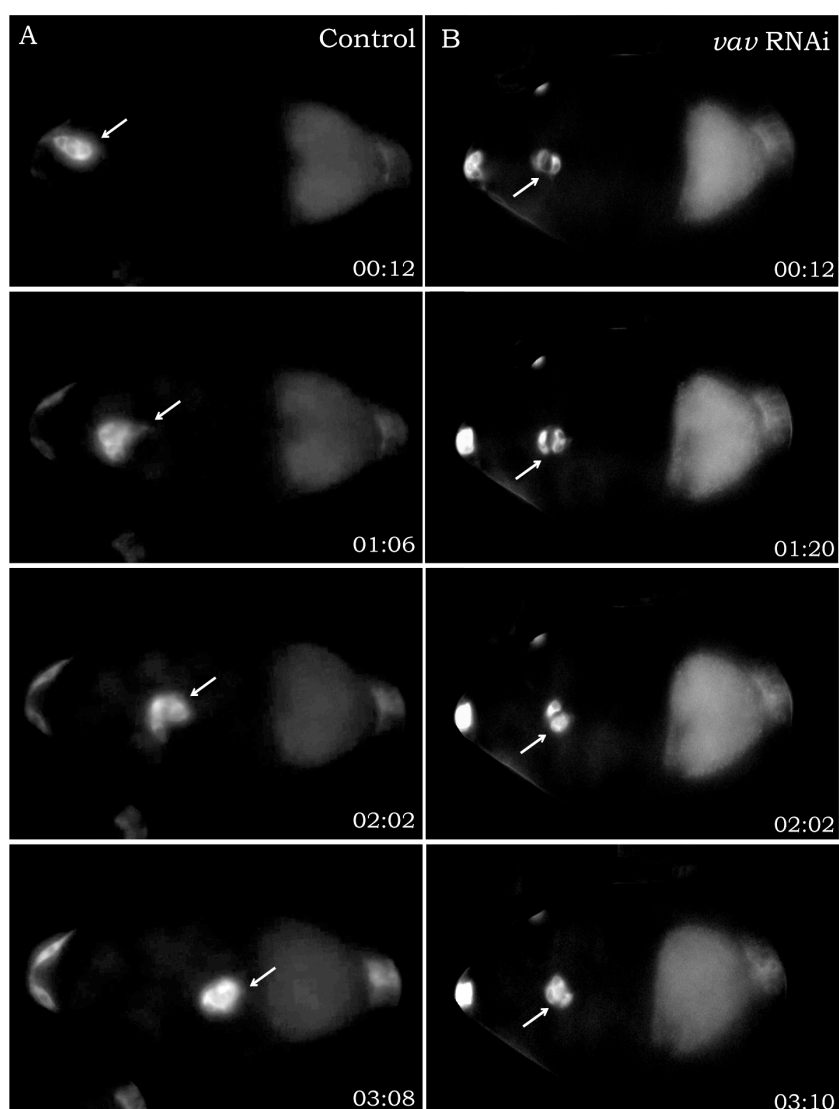


Figura 22.- Imagen *in vivo* de *vav*RNAi expresado en las BCs.

(A y B) Series de imágenes *in vivo* de cámaras huevo de estadio 9 de *slbo*-GAL4-UAS.moesin::GFP y *c306*-GAL4;*slbo*-GAL4-UAS.moesin::GFP/UAS.*vav*RNAi, respectivamente. (A) En una situación silvestre las BCs migran hasta contactar con el oocito. (B) Las cámaras huevo mutantes muestran un retraso en la migración. Las BCs quedan marcadas con flechas.

Para un análisis más preciso de la dinámica de las proyecciones durante la migración, se decidió cuantificar la distribución, tamaño, número y estabilidad de las mismas en la situación control y en la experimental. En este estudio se cuantificaron 7 cámaras huevo control y 7 experimentales que mostraban fenotipo. Para analizar la distribución de las proyecciones, éstas se representaron en un diagrama radial dividido en áreas que correspondían con ángulos que equivalían a las direcciones en las que podían ser emitidas las proyecciones, siendo 0° el frente del grupo de las BCs y 180° la parte opuesta. Se observó que en las BCs de cámaras huevo control la mayoría de las proyecciones eran emitidas hacia el frente, entre los ángulos 45° y 315°, encontrándose muy pocas en otras direcciones, lo que concordaba con lo descrito anteriormente (Poukkula et al., 2011; Fig.23 A y Fig.24 A). A continuación se analizó el número de las proyecciones emitidas por el grupo de BCs en la situación control y experimental. Se observó que la media de proyecciones emitidas en la situación control era de 12 proyecciones/grupo, mientras que en la situación mutante era de 26,5 (Fig.23 C).

Como hemos mencionado anteriormente, en una situación silvestre las proyecciones emitidas hacia el frente son más largas y estables (Poukkula et al., 2011). Se decidió analizar si este era también el caso en BCs con la expresión de *vav* reducida. Para analizar la estabilidad de las proyecciones, se cuantificó el tiempo que permanecía la proyección en el frente desde que aparecía hasta su completa desaparición. Se observó que la duración media de las proyecciones en el frente en la situación control era de 21,3 minutos, mientras que en la situación experimental era de 8 minutos (Fig.23 D). Finalmente, el análisis de la longitud máxima de las proyecciones en el frente reveló que mientras en el control la longitud media de las proyecciones hacia el frente era de 13,02 μm , en la situación experimental era de 7,38 μm (Fig.23 E).

En resumen, estas cuantificaciones demuestran que Vav se requiere para la correcta distribución de las proyecciones así como para la estabilidad y longitud de las proyecciones del frente.

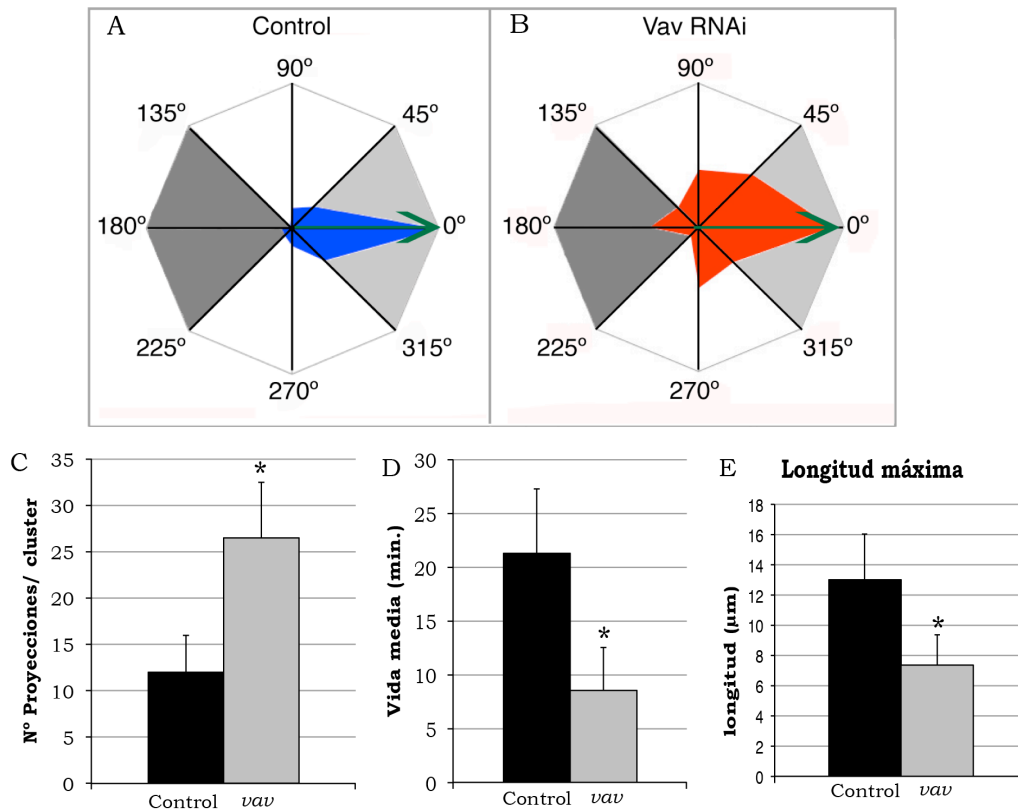


Figura 23.- Vav se requiere para la distribución de las proyecciones en el frente.

(A y B) Diagramas radiales ilustrando la distribución de las proyecciones en BCs silvestres (A, n=82) y BCs que expresan *vav*RNAi (B, n=160). La flecha en verde indica la dirección de la migración de las BCs hacia el oocito. (C, D y E) Histogramas del número de proyecciones por grupo (C), de la vida media de las proyecciones (D) y de la longitud de las proyecciones del frente (E) en cámaras huevo controles y mutantes. Las diferencias en C, D y E son estadísticamente significativas, $p = 0,0005$, $0,02$ y $0,0001$, respectivamente. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

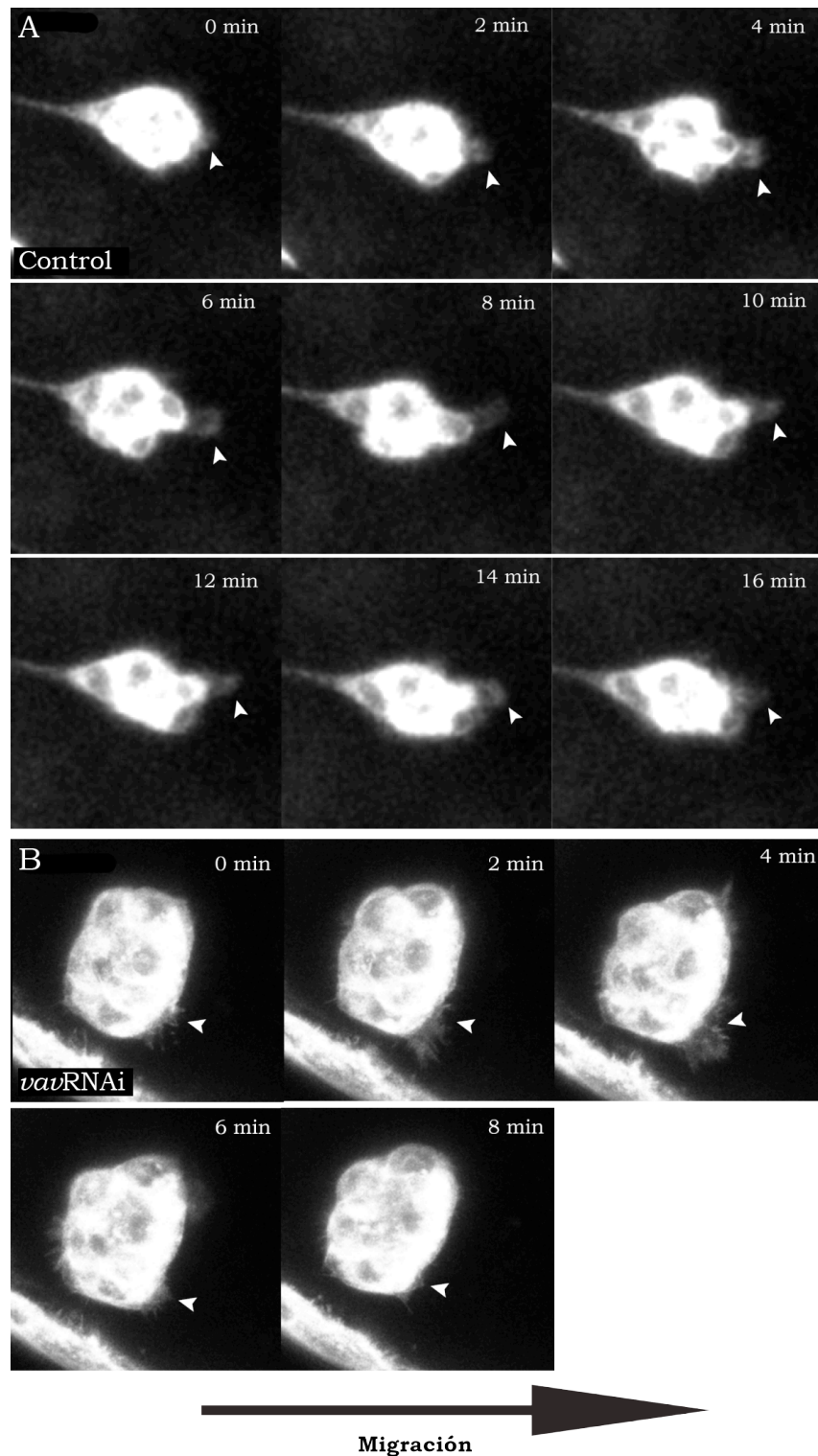


Figura 24.- Secuencia de imágenes del estudio *in vivo*.

(A y B) Cámaras huevo control S9 y mutante que expresan *vavRNAi*. En ambos casos se realizó el seguimiento de las BCs mediante GFP. En una situación control se observa una proyección en el frente de migración (punta de flecha) de 16 minutos de duración (A), mientras que en la situación mutante la proyección del frente (punta de flecha) tiene una duración de unos 8 minutos (B).

2.1.4 Vav determina la velocidad de migración de las BCs.

Como hemos mostrado anteriormente, en un 34% de los casos analizados, las BCs con un reducido nivel de expresión de Vav sufren un retraso en su migración. Por lo que se decidió cuantificar de forma más precisa la velocidad y la distancia así como la trayectoria de las BCs mutantes respecto de las control utilizando la técnica de tracking.

Se han descrito dos fases durante la migración de las BCs. Una primera fase que engloba desde que las BCs dejan el extremo anterior de la cámara huevo hasta que alcanzan la mitad de la distancia al oocito, llamada fase temprana, y una segunda fase que comienza donde finaliza la primera y acaba cuando las BCs han contactado con la membrana anterior del oocito, llamada fase tardía (Fig.25). El comportamiento de las BCs en cada fase es distinto. Así, en la fase temprana el grupo de las BCs se caracteriza por tener una morfología alargada y por migrar a una mayor velocidad, mientras que en la fase tardía adquiere una morfología más redondeada y se mueve más lentamente (Poukkula et al., 2011; Fig.26 D). Por ello, se decidió analizar el comportamiento de las BCs experimentales en ambas fases.

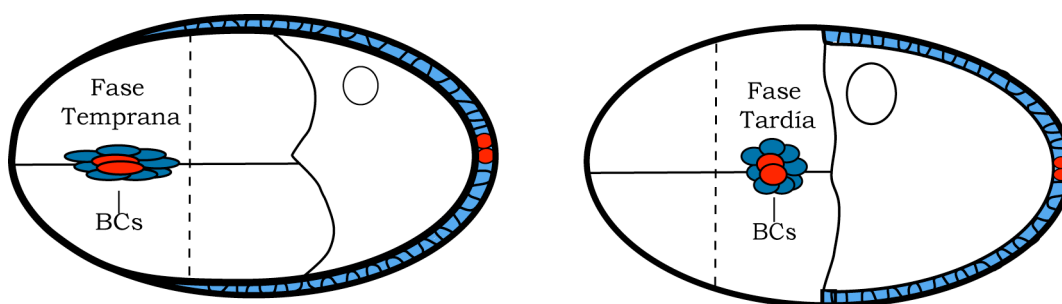


Figura 25.- Esquema de la fase temprana donde las BCs adquieren morfología alargada y la fase tardía donde son más redondeadas.

Para realizar el análisis de tracking se utilizaron imágenes *in vivo* de la situación control y experimental. Se analizaron cinco casos distintos para cada situación. La velocidad y la distancia recorrida se analizaron para ambas fases durante un tiempo aproximado de 1 hora 30 minutos. Ya que las BCs van cambiando de posición dentro del grupo durante su migración, el análisis de tracking no se podía hacer siguiendo una

célula individual, por lo que se decidió seguir el centro del grupo (ver Material y Métodos).

Respecto a la trayectoria que mantienen las BCs en la situación control y la situación experimental se observó que, mientras que en la situación silvestre el grupo de las BCs mantiene una trayectoria lineal en ambas fases de la migración, en la situación experimental la trayectoria es aleatoria en ambas fases y a menudo se observa que el grupo de BCs vuelve sobre sí mismo (Fig.26 A-C). Esta trayectoria no lineal de los mutantes podría ser la causa del descenso en la distancia recorrida y por lo tanto de la velocidad.

Por ello, en el siguiente paso, se decidió analizar la distancia que recorría el grupo de las BCs. Lo primero que se observó fue que las BCs control avanzaban sobre una línea prácticamente recta hacia el oocito, manteniendo la direccionalidad (Fig.26 C). Al analizar ambas fases de migración se observó que la distancia media calculada a partir del tracking, en donde se mide distancia entre dos puntos en el tiempo (ver Material y Métodos), era para ambas fases de unas 44 μm (Fig.26 F). En el caso de las BCs experimentales, la desviación de la direccionalidad era mucho mayor en cualquiera de las fases (Fig.26 C), de forma que aunque las BCs se movían constantemente la distancia que habían avanzado hacia el oocito era mucho menor que la conseguida por las BCs control. Así, la distancia lineal fue de 12,78 μm en la fase temprana y 11,15 μm en la fase tardía (Fig.26 F). En resumen, la distancia media recorrida por las BCs en una situación control es mayor que la distancia recorrida cuando los niveles de Vav son disminuidos.

A pesar de resultados publicados recientemente donde sugerían que las BCs silvestres se mueven a distintas velocidades en la fase temprana respecto a la tardía, nuestros resultados demostraban que en una situación control las BCs se mueven prácticamente a la misma velocidad en ambas fases, siendo ésta de media 0,54 $\mu\text{m}/\text{min}$. (Fig.26 A). A continuación se midió la velocidad media de migración en ambas fases en la situación experimental. Se observó que en ambas fases, la velocidad media de migración de las BCs experimentales era menor que la de la silvestre, obteniendo una velocidad media de 0,34 $\mu\text{m}/\text{min}$ en la

fase temprana y de 0,23 $\mu\text{m}/\text{min}$ en la fase tardía (Fig.26 E). Estos resultados indican que la falta de expresión de Vav afecta a la velocidad de migración en ambas fases.

Todos estos resultados demuestran que Vav se requiere para controlar la dirección y velocidad del movimiento de las BCs hacia el oocito.

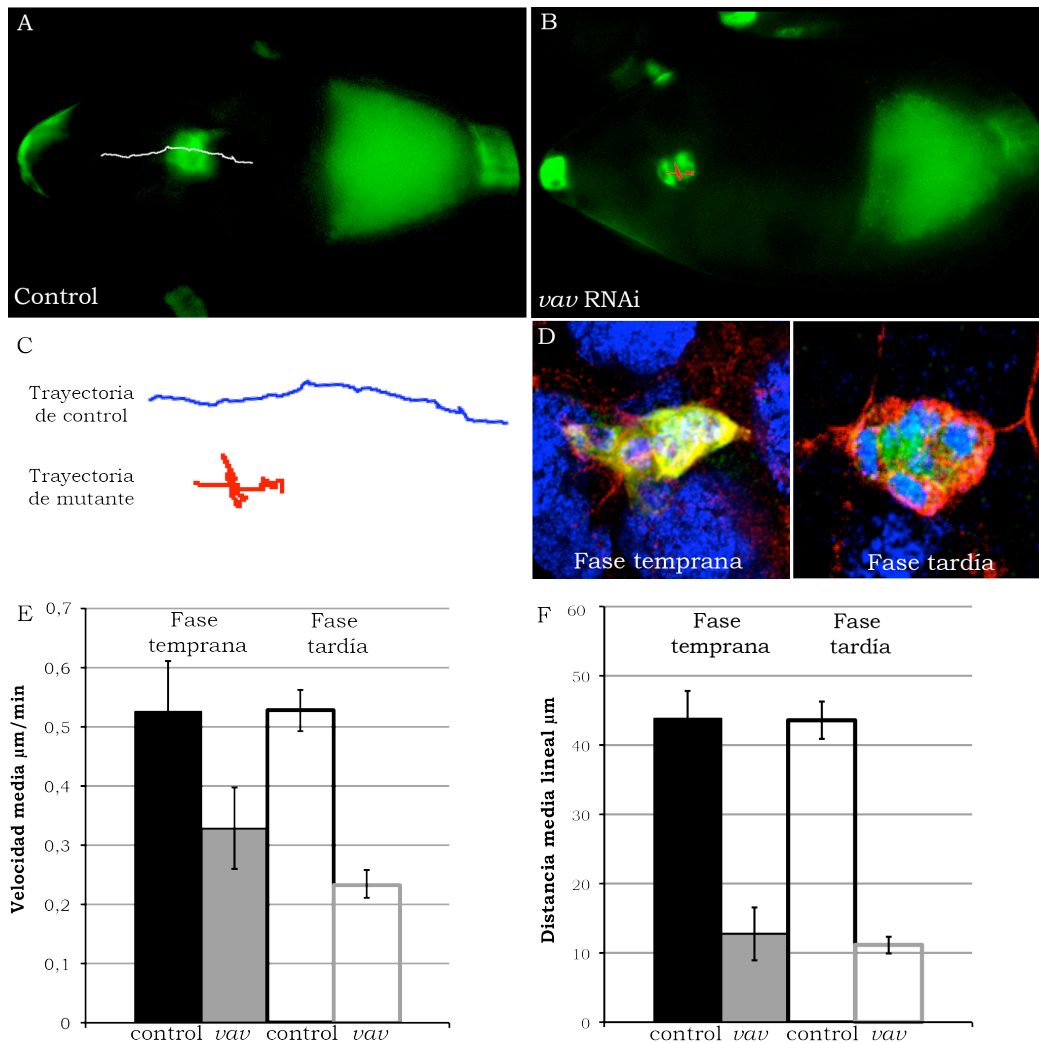


Figura 26.- Estudio de la velocidad y distancia lineal recorrida por las BCs. (A y B) Imagen obtenida de la secuencia *in vivo* de cámaras huevo control y mutantes. (C) Esquema de las trayectorias de las BCs control (azul) y mutante (roja). (D) Imágenes de confocal mostrando la morfología alargada en la fase temprana y redondeada en la fase tardía de un grupo de BCs control. Cuantificación de la velocidad media (E) y distancia media lineal (F) de BCs control (n=5 para cada fase) y mutantes (n=5 para cada fase). En ambas gráficas están representados los errores estándar de la media (SEM). Las diferencias entre las dos fases de los casos control frente a los mutantes son estadísticamente significativas ($p < 0,0001$).

2.1.5 Vav actúa como GEF para Rac1 en las BCs.

Como se ha mencionado anteriormente, uno de los papeles de Vav es actuar como GEF, de manera que la forma fosforilada de Vav cataliza el intercambio de GDP a GTP de la proteína Rac1 activándola (Ridley, 1995; Boguski and McCormick, 1993). Por ello, se quiso estudiar si Vav regulaba a Rac1 durante la migración de las BCs. Si este fuera el caso cabría esperar que los fenotipos de falta de función de Vav y Rac1 fueran similares. Para testar si este era el caso se compararon los fenotipos de migración derivados de la expresión del RNAi de *vav* en BCs con aquel que se obtenía tras expresar una forma dominante negativa de Rac1 (Rac1^{DN}). Como se había demostrado anteriormente (Duchek et al., 2001a), la expresión de Rac1^{DN} en BCs produce un retraso en la migración y un descenso de los niveles de actina localizada en el frente que son similares a los obtenidos cuando se expresa RNAi de *vav* (Fig.27 B y C).

De la misma manera, si Rac1 estuviese corriente abajo de Vav cabría esperar que los fenotipos de la activación ectópica de cualquiera de ellos fueran similares. La expresión de la forma constitutivamente activa de Rac1, Rac1^{V12}, bloquea la migración de las BCs e incrementa la acumulación de actina que además se encuentra ahora distribuida de manera más homogénea alrededor de todo el grupo de BCs (Duchek et al., 2001; Fig.27 D). Así mismo, se produce un bloqueo total de la migración (Fig.27 F). Por ello, se decidió testar si la expresión en BCs de una forma constitutivamente activa de Vav, Vav^{act} resultaba en un fenotipo similar. Existen formas constitutivamente activas de Vav, las cuales se generaron mutando o eliminando la región amino-terminal que está involucrada en la autoinhibición de la proteína, de forma que al eliminarla Vav está permanentemente activa (ver Introducción) (Couceiro et al., 2005). Además, esta forma constitutivamente activa de Vav contiene el epítipo HA lo que permitía detectarla. Se observó que la expresión de esta forma activa de Vav resultaba en un incremento de actina y una redistribución de la misma alrededor de todo el grupo (Fig.27 E). Este fenotipo se asemejaba mucho al observado cuando se expresaba la forma activa de Rac1 (Fig.27 D). Así mismo, se observó que

la expresión de Vav^{act} producía un bloqueo casi total de la migración (Fig.27 F).

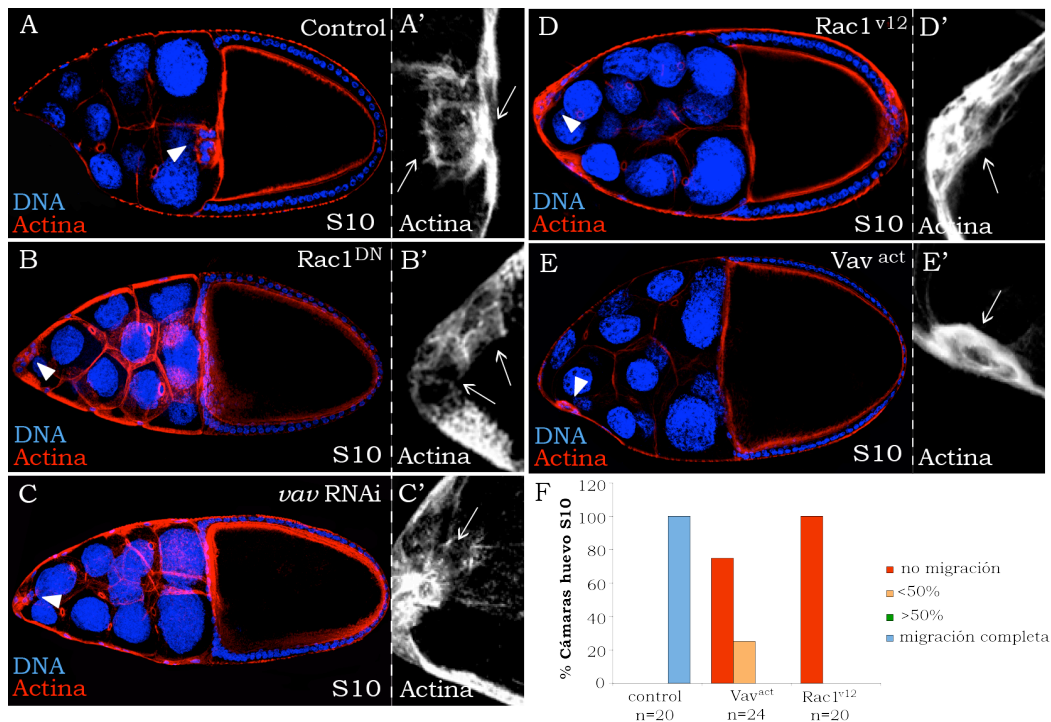


Figura 27.- La expresión ectópica de Vav^{act} bloquea la migración y produce acumulación de actina en las BCs.

(A-C) Panel de cámaras huevo S10 control (A), la forma dominante negativa de Rac1 ($Rac1^{DN}$) (B), expresión de $vavRNAi$ (C) y las formas activas de Rac1 ($Rac1^{v12}$) (D) y de Vav (Vav^{act}) (E). En todos los casos, los cámaras huevo están marcados con un marcador nuclear TO-PRO-3 (azul) y rhodamine-phalloidin marcando la actina (rojo). En los casos donde se expresan $Rac1^{DN}$ y $vavRNAi$ se observa una disminución de actina en el frente y un bloqueo de la migración (B y C). Del mismo modo, la expresión de las formas activas $Rac1^{v12}$ y Vav^{act} muestran una acumulación de actina en el frente y un bloqueo de la migración (D y E). (A'-E') Magnificación del canal rojo mostrando la distribución de actina. (F) Cuantificación del fenotipo de migración de las formas activas.

En el siguiente paso, se decidió testar por qué la expresión de una forma activa de Vav producía un bloqueo casi total de la migración. Como hemos demostrado anteriormente Vav se requiere para la formación y estabilidad de las proyecciones, una posible explicación para el fenotipo debido a la expresión de Vav^{act} podría ser que esta forma estuviera formando y/o estabilizando proyecciones en todas las direcciones, lo que confundiría a la célula provocando un bloqueo del movimiento. Para testar esta posibilidad se analizó por una parte la localización de Vav^{act} y por otra la dinámica de las proyecciones en BCs que expresan Vav^{act} . Un análisis de la localización de Vav^{act} mediante

tinción con anti-HA reveló que el Vav^{act} se acumulaba en proyecciones (Fig.28).

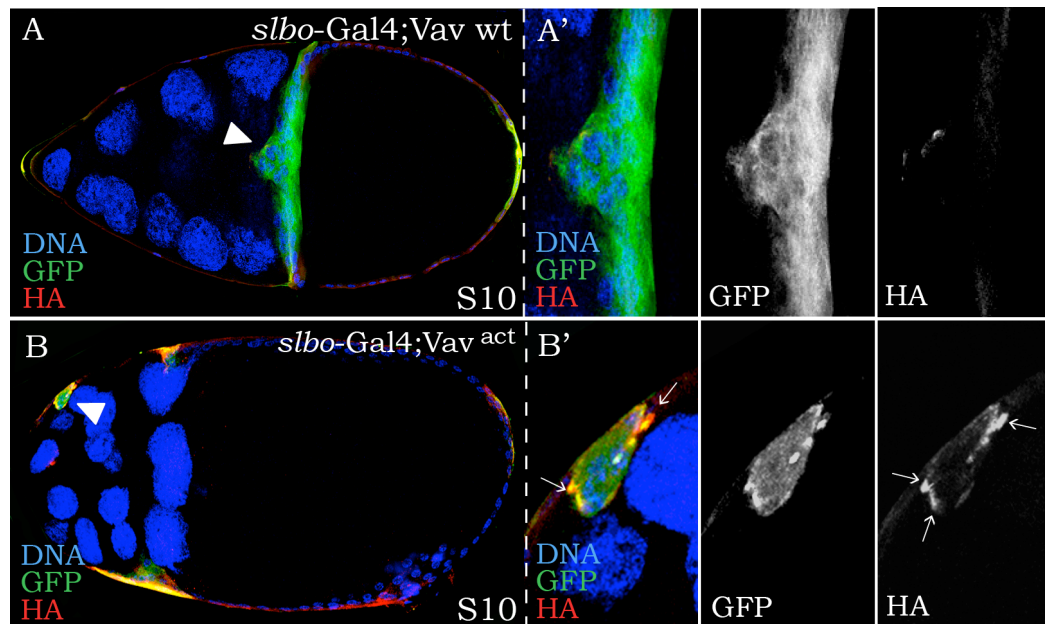


Figura 28.- Expresión de Vav^{act}-HA.

A y B) Cámaras huevo de estadio 10 que expresa Vav wt-HA y Vav act-HA, respectivamente. En ambos casos la expresión está dirigida mediante *slbo-GAL4-UAS.moesin::GFP*. En ambos casos, los cámaras huevo están marcados con anti-GFP (verde), un marcador nuclear TO-PRO-3 (azul) y anti-HA (rojo). Se observa que en un S10 donde las BCs contactan con el oocito, la expresión de Vav desaparece prácticamente de las BCs que expresan Vav wt-HA (A) mientras que, en BCs que expresan Vav^{act}-HA, Vav se localiza alrededor del grupo de las BCs y en mayor medida en las proyecciones (B). (A' y B') Magnificación de las BCs.

Asimismo, el análisis *in vivo* confirmó que las BCs que expresaban Vav^{act}, aunque no se delaminaban del epitelio, emitían proyecciones de gran tamaño en todas las direcciones (Fig.29 B y C).

En resumen, estos resultados sugieren que Vav regula la reorganización del citoesqueleto de actina y la formación y estabilización de proyecciones. Asimismo, la similitud de los fenotipos debido tanto a la sobreactivación como a la reducción de la expresión de Vav y Rac1 sugiere que ambas moléculas podrían estar implicadas en la misma vía de señalización.

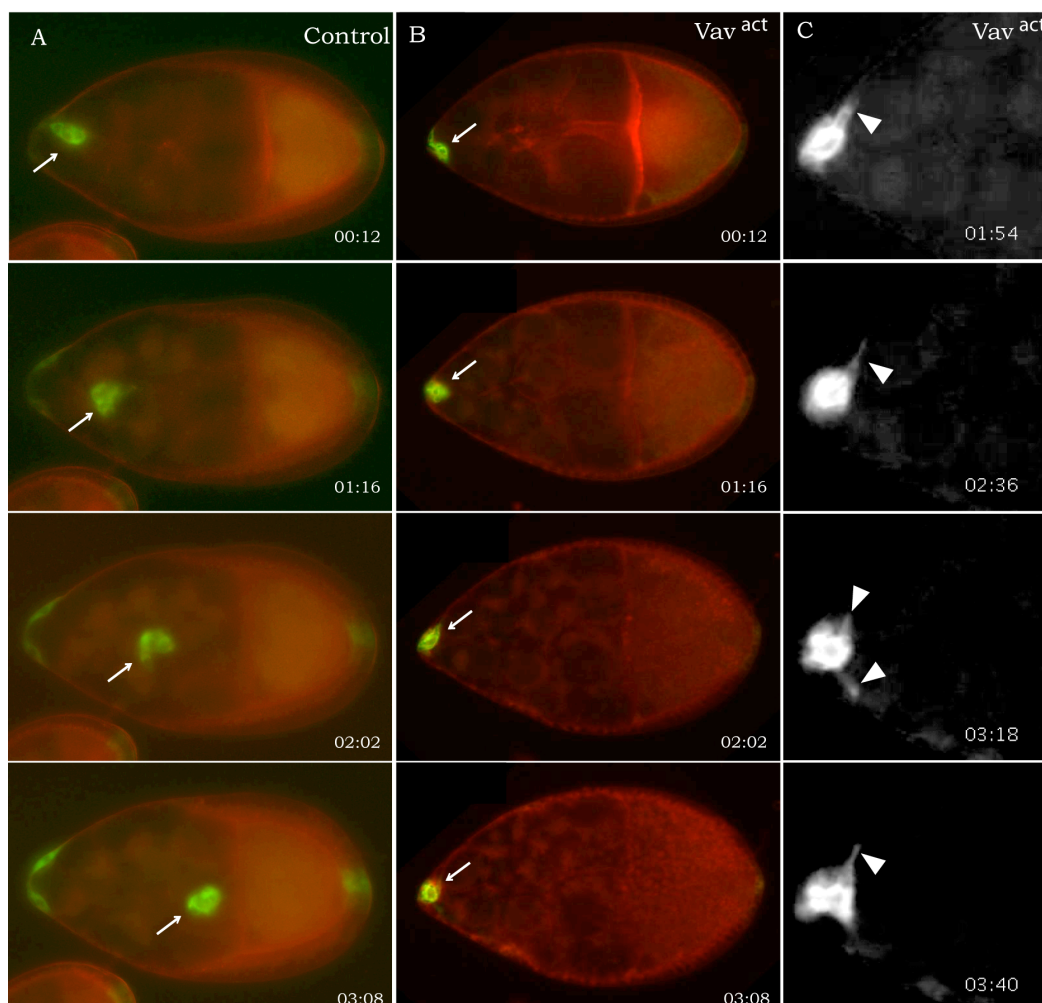


Figura 29.- Análisis *in vivo* de la expresión de la Vav^{act}.

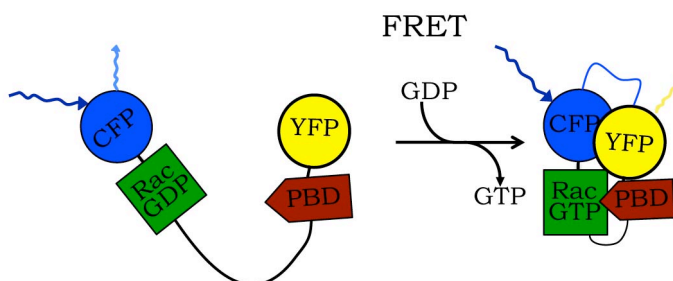
(A y B) Serie de imágenes del análisis *in vivo* de la migración de las BCs desde un S9. Las BCs (flechas) están marcadas por la expresión de GFP (verde) y las membranas están marcadas con el colorante FM4.64 (rojo). (A) En una situación control, las BCs migran hacia el oocito. (B) En cámaras huevo que expresan Vav^{act}, las BCs no son capaces de migrar. (C) Amplificación de la imagen donde se observa la emisión de las proyecciones (punta de flecha).

2.1.6 Vav regula la actividad de Rac1 en las BCs.

Puesto que hemos mostrado que Vav y Rac1 regulan de una manera similar el citoesqueleto de actina y ya que Vav se comporta como GEF para Rac1 en otros contextos celulares, se decidió analizar si Vav regulaba la actividad de Rac1 durante la migración de las BCs. Para ello, en colaboración con los Drs. Damien Ramel y Gregory Emery pertenecientes a IRIC, en Canadá, se decidió utilizar la técnica de FRET, procedente del inglés ***F*luorescence *R*esonance *E*nergy *T*ransfer**. Esta técnica permite detectar interacción entre proteínas mediante emisión

de fluorescencia (ver Material y Métodos). Para realizar este estudio se generaron moscas que contenían la construcción UAS.Rac1FRET junto con *slbo*-GAL4 que dirigirían su expresión en las BCs.

Figura 30.-Esquema del sistema FRET. La proteína Rac1-GDP contiene el fluorocromo CFP, mientras que el dominio de unión al Rac1-GTP, PBD, contiene YFP. Cuando la proteína Rac1 está activa, unida a GTP, se detecta el fluorocromo YFP.



La construcción UAS.Rac1FRET contiene la proteína Rac1 unida al fluorocromo CFP (**C**yan **F**luorescent **P**rotein) y un dominio que se une a la forma activa de Rac1, Rac1-GTP, denominado PBD (**P**21 **B**inding **D**omain), unido al fluorocromo YFP (**Y**ellow **F**luorescence **P**rotein) (Fig.30). Cuando la proteína Rac1 está inactiva, unida a GDP, el dominio PBD-YFP no se une a Rac1-CFP de manera que el fluorocromo que se detecta es el CFP. Cuando Rac1 se encuentra activa, unida a GTP, el dominio PBD-YFP se une a Rac1-CFP de manera que en este caso el fluorocromo que se detecta es el YFP (ver Material y Métodos).

Utilizando esta técnica de FRET, estudios preliminares han demostrado que los niveles más altos de la actividad de Rac1 se localizan en el frente de migración en una situación silvestre (Wang et al., 2010; Fig.31 B). En el laboratorio del Dr. Gregory Emery se realizó el análisis de FRET en BCs que expresaban el RNAi de *vav* y se comparó con el control. Los resultados demostraron que los niveles de Rac1 activados eran menores en la situación experimental respecto al control (Fig.31 B y C). Aún más, cuando se analizó en más detalle la activación de Rac1 en el frente versus la parte trasera del grupo de BCs, se observó que si bien los niveles de Rac1 activo en la parte de atrás del grupo apenas cambiaban en la situación experimental respecto al control, los niveles en el frente de migración eran significativamente menores en la situación experimental (Fig.31 B y D).

Estos resultados demuestran que Vav regula la activación localizada de Rac1 en el frente.

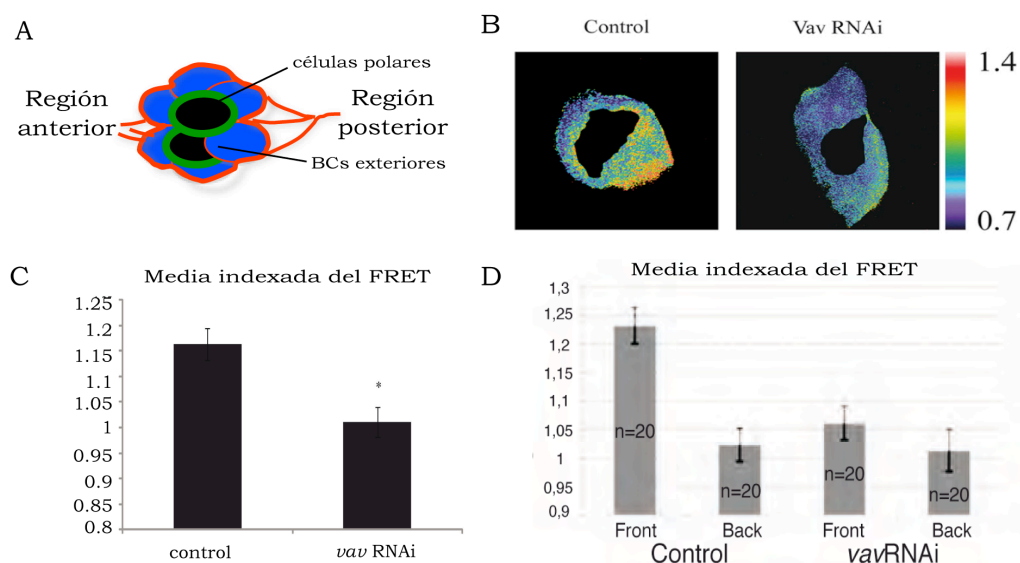


Figura 31.- Análisis de la activación de Rac1 mediante FRET.

A) Esquema de la estructura del grupo de las BCs, en azul se muestran las BCs exteriores y en negro las PCs. B) FRET de un grupo de BCs control, en el que se observa una actividad mayor de Rac1 en el frente y de BCs que expresan *vav* RNAi. En el centro de las BCs se encuentran las PCs (negro) que no expresan *slbo*-GAL4. C) Cuantificación del FRET en el control y en la situación mutante. D) Cuantificación del FRET entre el frente y la parte trasera.

2.2 Vav interacciona genéticamente con los receptores tirosina kinasas EGFR y PVR.

La inhibición individual de la función de los RTKs EGFR y PVR causan defectos en la migración de las BCs similares a los que hemos obtenido cuando disminuimos la función de Vav (Duchek et al., 2001a). Además, experimentos de doble híbrido en levaduras que usaban como proteínas cebo los dominios citoplasmáticos de PVR y EGFR identificaron a varios GEFs entre los cuales se encontraba Vav (Bianco et al., 2007). Por último, experimentos en cultivos celulares demostraron que Vav se fosforila corriente abajo de EGFR (Hornstein et al., 2003). Por todo ello, en colaboración con el laboratorio de Shulamit Katzav de la Universidad Hebrea de Jerusalén, se decidió testar si la activación de PVR también era capaz de inducir fosforilación de Vav en células S2 de *Drosophila*. Se

observó que, la activación de PVR por su ligando Pvf1 era capaz de fosforilar a Vav. Como se ha mencionado anteriormente, Vav se activa por fosforilación (Garrett et al., 2007), por lo tanto estos resultados sugerían que la activación de los receptores PVR y EGFR por sus ligandos inducía la activación de Vav en células S2 de *Drosophila* (Fernández-Espartero et al., 2013).

El siguiente paso fue testar si *vav* actuaba corriente abajo de ambos receptores durante la migración de las BCs. Para ello, se realizaron experimentos de interacción genética. Si *vav* fuera el único GEF corriente abajo de ambos receptores el fenotipo de falta de función de *vav* debería ser el mismo que la falta de función simultánea de ambos receptores. Sin embargo, sabíamos que este no era el caso, ya que la eliminación de ambos receptores producía un fenotipo muy fuerte de migración, donde se observaba un retraso en la migración en más del 90% de los casos (Duchek et al., 2001a). En un escenario alternativo, Vav podría comportarse como el único GEF corriente abajo de sólo uno de los receptores. Si este fuera el caso, y por ejemplo Vav actuase corriente abajo de EGFR y no de PVR, cabría esperar que el fenotipo de la eliminación de *vav* fuese parecido al de eliminar sólo EGFR y que se viese incrementado cuando eliminamos simultáneamente PVR. De la misma manera, si Vav actuase corriente abajo sólo de PVR, el fenotipo de la eliminación de *vav* debería ser similar al de eliminar sólo PVR y se vería incrementado cuando se eliminase al mismo tiempo el EGFR. Para testar esta posibilidad, se generaron clones dobles mutantes para *vav-;egfr-* y *vav-;pvr-* y se compararon sus fenotipos con aquellos obtenidos tras la eliminación individual de cada uno de los genes. En el análisis de los fenotipos se observó un retraso en la migración en el 77%, 40% y 66% de las cámaras huevo que portaban BCs mutantes para *vav*, *pvr* y *egfr* respectivamente, no observándose en ninguno de los casos falta completa de la migración. Sin embargo, en los dobles mutantes para *vav-;pvr-* observamos un bloqueo total de la migración en un 23% de los casos analizados. Por lo tanto, la falta de función de ambos *vav* y *pvr* genera un incremento en el fenotipo de retraso de migración de las BCs respecto a la eliminación individual de cada uno de ellos. De manera similar, al analizar los clones dobles mutantes para *vav-;egfr-*

observamos que el fenotipo de retraso de migración era más fuerte que el fenotipo debido a la ausencia de cada uno de ellos. Así, mientras que en los dobles mutantes *vav*;*egfr*- se observaba un retraso en el 83% de los casos analizados, en los mutantes individuales de *vav*- y *egfr*- era del 77% y del 66%, respectivamente. (Fig.32).

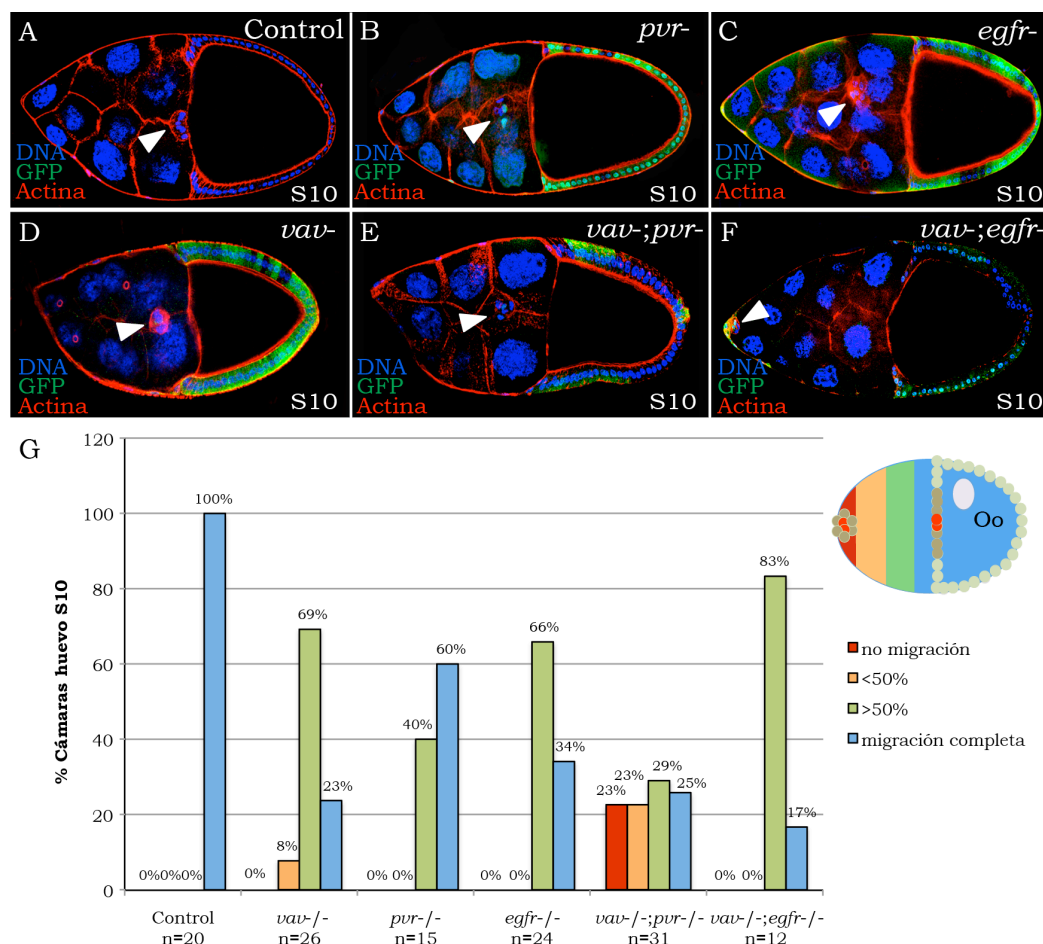


Figura 32.- Vav interacciona genéticamente con PVR y EGFR.

(A-F) Panel de cámaras huevo control S10 (A), *egfr*-, *pvr*- y *vav*- (B, C y D respectivamente) y *vav*;*egfr*- y *vav*;*pvr*- (E y F respectivamente). En todos los casos, las células silvestres están marcadas con GFP mientras que las células mutantes son GFP negativas. (G) Cuantificación del fenotipo de migración de las BCs.

Este mismo estudio se realizó expresando formas dominantes negativas (DN) para los RTKs en BCs. Las formas dominantes negativas de estas proteínas proceden de construcciones en las que se elimina el dominio citoplasmático donde reside la actividad kinasa. Estas formas pueden dimerizar con los receptores endógenos inhibiendo así su función (Freeman, 1996). Estas formas se expresaron, usando el sistema GAL4-

UAS, en cámaras huevos que portaban BCs mutantes para el gen *vav* (Fig.33). El resultado fue similar al obtenido con la generación de dobles clones aunque el porcentaje de cámara huevos con defectos en la migración de las BCs aumentaba. Esta variación en los resultados podría ser debida a que en el caso de los DN, los RTKS se están suprimiendo en todo el grupo de las BCs mientras que, los clones se generan en ciertas células del grupo y rara vez se obtienen grupos mutantes completos.

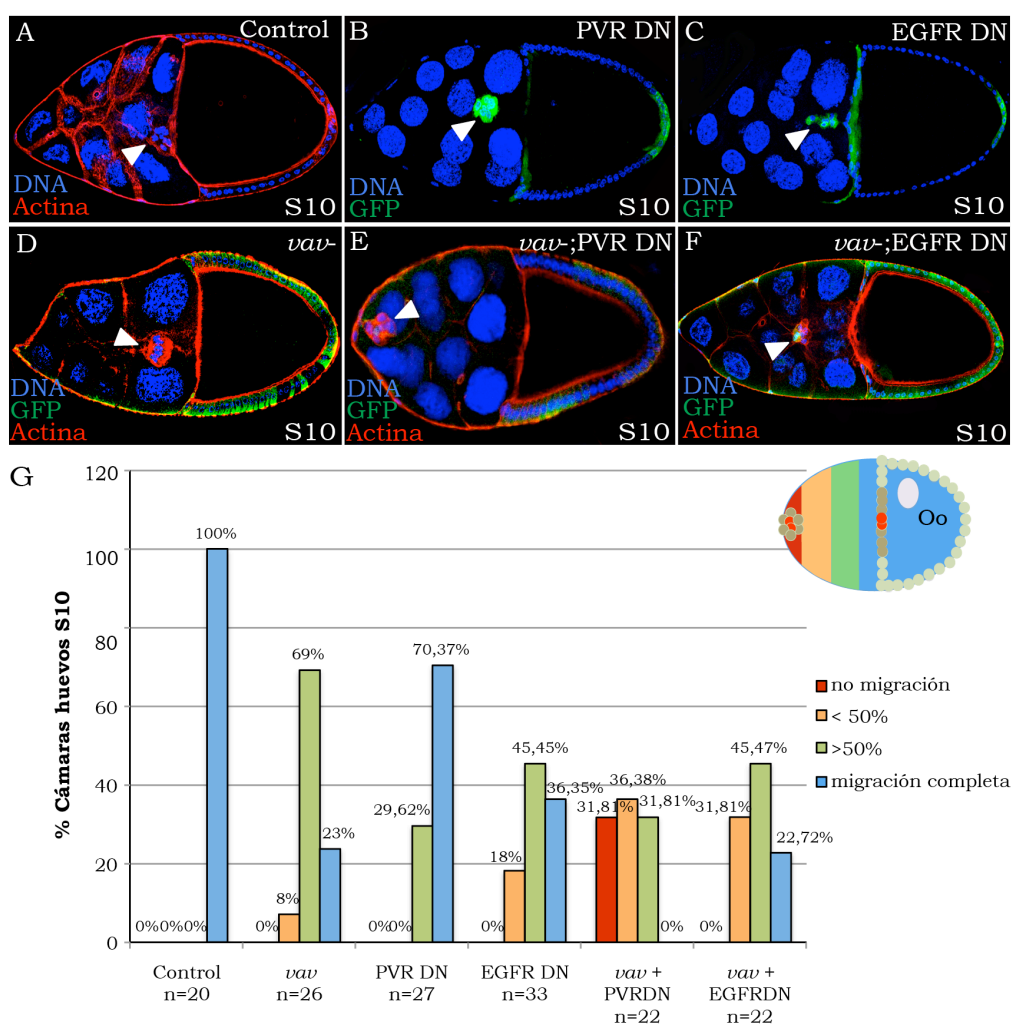


Figura 33.- Interacción genética entre *vav* y los dos RTKs, PVR y EGFR.

(A-F) Panel del estudio del fenotipo de migración de las BCs utilizando clones mutantes para *vav* (D) y expresión de formas DN de PVR (B) y EGFR (C). (E y F) Dobles mutantes con clones de *vav*;PVRDN y *vav*;EGFRDN respectivamente. Las BCS quedan marcadas con punta de flecha. (G) Cuantificación del fenotipo de migración.

Los datos de las interacciones genéticas que mostraban que el fenotipo de migración de la falta de *vav* se veía incrementado cuando se

eliminaban al mismo tiempo cualquiera de los dos receptores no casaba con una hipótesis en la cual Vav estuviese corriente abajo de uno de los receptores y nos hizo pensar en una tercera alternativa. En este nuevo escenario, Vav actuaría corriente abajo de los dos receptores en combinación con otros GEFs u otras proteínas (Fig.34).

En resumen, los requerimientos de Vav en el proceso de migración de las BCs, su actividad como GEF de Rac-1 y su interacción tanto bioquímica como genética con los receptores EGFR y PVR nos llevan a proponer el siguiente modelo: la activación polarizada de EGFR y PVR por sus ligandos en el frente de migración activarían por fosforilación a Vav el cual a su vez activaría de manera localizada a Rac1 lo que promovería la estabilización de proyecciones en el frente de migración y una migración dirigida hacia el oocito (Fig.34).

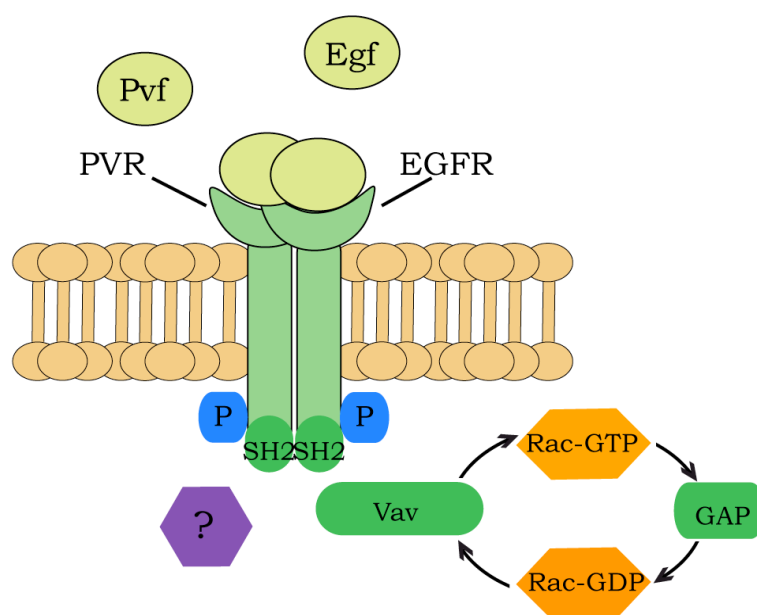


Figura 34.- Modelo.

Los ligandos secretados desde el oocito, activan a los dos RTKs, en el frente de las BCs. Una vez activados reclutan a Vav activándolo por fosforilación lo que induce la activación localizada de Rac-1. Probablemente, PVR y/o EGFR reclutan a otros factores (?) por determinar, que también regularían la migración de las BCs.

2.3 Análisis de otros GEFs implicados en migración de BCs y su interacción con Vav.

Como se ha mencionado en la introducción, los GEF son activadores de las Rho GTPasas. Como tales, actúan en diversos procesos biológicos en los cuales se requiere de la participación de las Rho GTPasas. Además, en muchos de estos casos existe más de un GEF involucrado en un determinado proceso celular específico. Este es precisamente el caso de *vav* en *Drosophila*. Trabajos realizados anteriormente en nuestro laboratorio demostraron que *vav* se requería en el sistema nervioso para una correcta axogénesis donde actuaba en colaboración con otras dos GEFs, *trio* y *sos* (Malartre et al., 2010). Por ello, decidimos analizar si estas dos GEFs tenían algún papel en la migración de las BCs. Para el análisis de la función de *trio* se usaron por una parte RNAis y por otra se generaron clones ya que existían alelos nulos en cromosomas FRT. Con ninguno de estos métodos la eliminación de *trio* causó ningún fenotipo de retraso de migración de las BCs. Estos resultados sugerían que *trio* no era esencial para la migración de las BCs. Alternativamente, *trio* podría actuar redundantemente con *vav*. Para testar esta hipótesis, se coexpresaron los RNAi de *vav* y *trio* en las BCs. Se observó que si bien la expresión del RNAi de *vav* bloqueaba la migración en un 2% de los casos, la coexpresión simultánea de ambos RNAis aumentaba el fenotipo de migración de forma que ahora se producía un bloqueo en un 13,9% (Fig.35). Estos resultados sugirieron que Trio podría actuar de manera redundante con Vav durante la migración de las BCs.

Para analizar el papel de *sos* en la migración de las BCs utilizamos la técnica del RNAi, ya que no se disponían de alelos nulos de *sos* en cromosomas que portaran las secuencias FRT. De manera similar a lo que ocurrió con *trio* la expresión del RNAi de *sos* en las BCs no produjo ningún fenotipo de migración. Sin embargo, en este caso la expresión del RNAi de *sos* no produjo ningún efecto en la migración de BCs que expresaban el RNAi de *vav* (Fig.35). Estos resultados sugirieron por una parte que la función de *sos* no era esencial para la migración de las BCs y por otra parte, que no parecía cooperar con *vav* en este proceso. Sin embargo, no podemos excluir la posibilidad de que el RNAi de *sos* no sea efectivo. Por ello, para obtener resultados más concluyentes

necesitaríamos o bien analizar la eficacia del tratamiento con RNAi mediante PCR cuantitativa o tinción con anticuerpos o generan líneas con alelos nulos de *sos* con la secuencia FRT para poder generar clones mutantes.

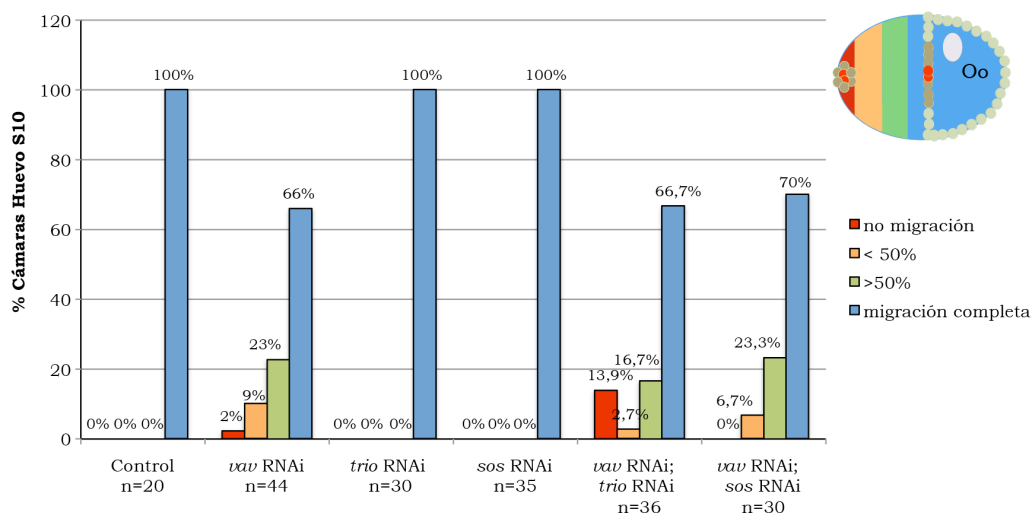


Figura 35.- Cuantificación de los fenotipos de migración correspondientes con la expresión de lo RNA interferentes de *vav*, *trio* y *sos*.

2.4 Interacción de la proteína Vav con otros activadores de Rac, el complejo Mbc /ELMO, en la migración de las BCs.

Estudios realizados en el laboratorio de la Dra P. Rorth han demostrado que una GEF no convencional llamada Myoblast city (Mbc), la cual es un regulador de Rac1, y su proteína adaptadora, Elmo, están implicadas en la migración de las BCs, aunque la actividad de Mbc como GEF en BCs aún no se ha testado (Duchek et al., 2001a). Por otra parte, se ha propuesto que el complejo ELMO/Mbc actúa corriente abajo de PVR/EGFR en las FCs, ya que la eliminación de *mbc* rescata el fenotipo de acumulación de actina que se observa en FCs que expresan una forma constitutivamente activa de PVR (Duchek et al., 2001a). Por ello, decidimos estudiar si el complejo Mbc/Elmo podría ser uno de los posibles candidatos que actuaran corriente abajo de PVR/EGFR junto con Vav durante la migración de las BCs. Para ello realizamos estudios

de interacciones genéticas mediante el uso de RNA interferentes de *mbc*, *elmo* y *vav*.

Observamos que la expresión de los RNAis de *mbc* o de *elmo* producían un fenotipo de retraso en la migración de las BCs (Fig.36 B-D y G), lo que concordaba con el análisis de la falta de función de estos genes en BCs (Duchek et al., 2001; Poukkula et al., 2011). Para estudiar la interacción genética de Vav con este complejo, coexpresamos los RNAi de *vav* con los de *mbc* y *elmo* y comparamos los fenotipos con aquellos obtenidos tras la expresión de cada RNAi de manera individual. Nuestros resultados mostraron que el fenotipo de retraso en la migración se incrementaba al co-expresar cualquiera de los RNAis simultáneamente (Fig.36 E-G). Así, mientras que la expresión individual de los RNAi para *vav*, *mbc* and *elmo* resulta en un 2%, un 0% y un 5% de bloqueo de migración respectivamente, la co-expresión simultánea de los RNAis para *vav* y *mbc* y para *vav* y *elmo* resultaba en un 5,5% y un 12% de bloqueo, respectivamente. De la misma manera, se observó un incremento en el número de casos en los cuales las BCs migraban menos de un 50% (Fig.36).

Estos resultados muestran una interacción genética entre Vav y el complejo Mbc/ELMO, sugiriendo que podrían actuar en el mismo proceso. En el futuro sería interesante testar si Vav y el complejo Mbc/ELMO se requieren para alcanzar los niveles correctos de activación de Rac1 en las BCs.

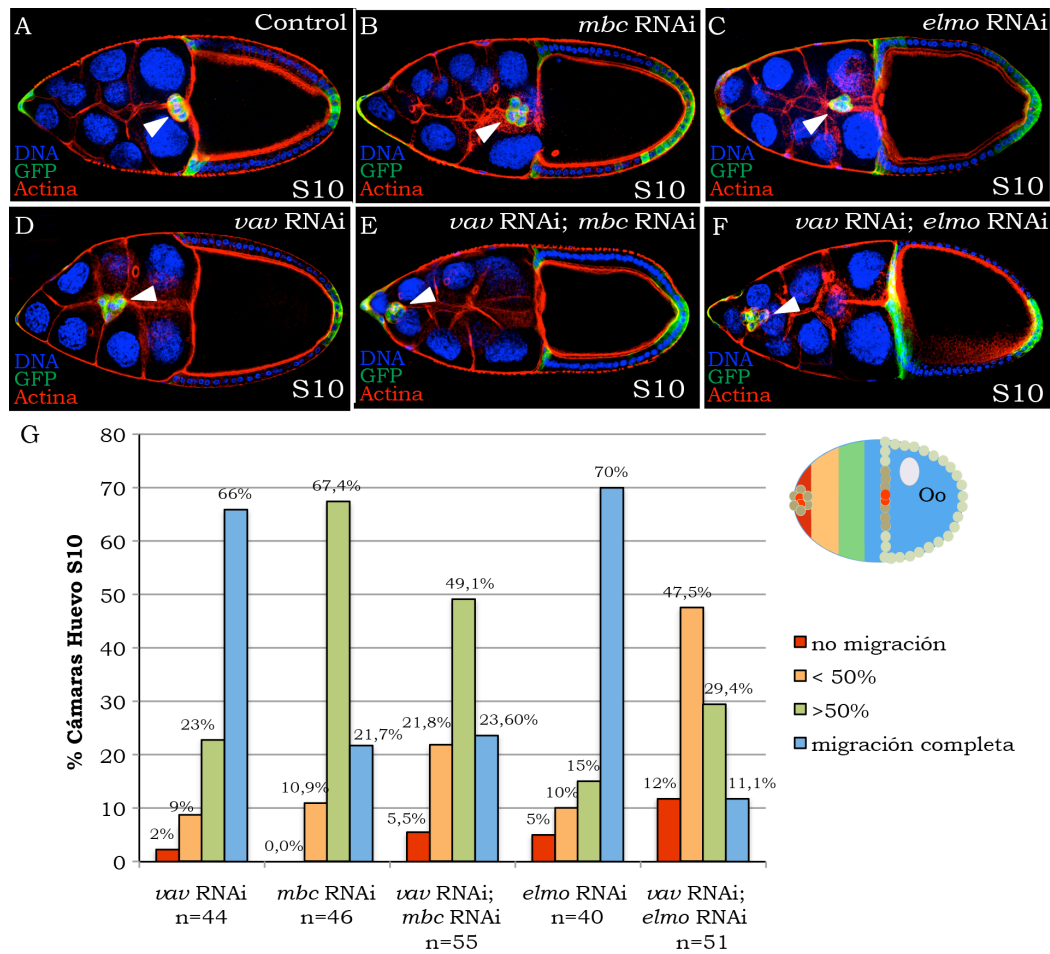


Figura 36.- Interacción genética entre *vav* y *mbc/elmo*.

(A-F) Panel del estudio del fenotipo de migración de las BCs utilizando RNA interferentes para *vav* (D), *mbc* (B) y *elmo* (C). (E y F) Coexpresión de los RNAi de *vav* y *mbc* y *elmo* respectivamente. Las BCs quedan marcadas con punta de flecha. (G) Cuantificación del fenotipo de migración.

Discusión

La migración celular es un proceso esencial que tiene lugar tanto durante el desarrollo embrionario como en la vida adulta del organismo y que requiere de la participación de complejas rutas de señalización celular para su correcta regulación. Disfunciones de los componentes de estas rutas de señalización provocan alteraciones en la migración celular que pueden dar lugar a graves patologías como el cáncer. Sin embargo, aún no se conocen todas las proteínas implicadas en el proceso de migración celular, ni cómo se relacionan entre ellas. Debido a la dificultad que supone el estudio de los eventos de migración celular en vertebrados, y en particular los de migración colectiva, se han empleado organismos modelo más sencillos como *Drosophila melanogaster*. Un elegante modelo utilizado para el estudio de la migración celular, y en particular de la migración colectiva, es la migración de las BCs del ovario de *Drosophila*, las cuales migran en un proceso similar a una EMT. Una mejor comprensión de los mecanismos por los cuales tiene lugar la migración colectiva será muy útil para entender patologías como la invasión de los tumores y así poder diseñar nuevas estrategias terapéuticas que mejoren su tratamiento.

Con el objetivo de encontrar nuevos genes implicados en el proceso de migración celular, se han llevado a cabo numerosos escrutinios tanto genéticos como bioquímicos en *Drosophila*, los cuales han dado gran información acerca de los mecanismos moleculares por los cuales tiene lugar este tipo de migración celular.

Entre las estrategias genéticas utilizadas cabe destacar la mutagénesis mediante inserciones al azar de elementos P en el genoma de *Drosophila* y posterior análisis del efecto de estas inserciones en la migración de las BCs. Mediante esta estrategia se identificó al factor de transcripción *slow border cells (slbo)* como un importante regulador de la especificación y migración de las BCs (Montell et al., 1992). Sin embargo, su función solo se observó cuando los alelos generados eran hipomorfos, ya que, alelos nulos para este gen producían letalidad durante el desarrollo embrionario impidiendo el estudio de la falta completa de función del gen *slbo* en las BCs (Montell et al., 1992). Una estrategia alternativa de búsqueda de nuevos genes requeridos durante

la migración de las BCs, es la generación de clones mosaico en tejido adulto (Theodosiou and Xu, 1998). Este método permite obtener células nulas para un gen específico en un tejido determinado, como las BCs, pudiéndose observar fácilmente el efecto en la migración sin producir letalidad en el organismo. Entre los genes identificados con este sistema caben destacar los genes *taiman* y *jing* (Liu and Montell, 1999; Liu & Montell, 2001; Bai et al., 2000). A pesar de la eficacia de esta técnica, en numerosas ocasiones el fenotipo de migración en las BCs sólo se observa cuando la pérdida de la función de un determinado gen ocurre en la mayoría de las células que componen el grupo de las BCs, lo cual sucede con una frecuencia relativamente baja. Como alternativa a esta estrategia se ha utilizado el sistema GAL4/UAS para expresar en las BCs colecciones de UAS-RNAis que representan a la mayoría de los genes en *Drosophila* con la intención de disminuir sus niveles de expresión y analizar el efecto que esto tiene en la migración de las BCs. Usando este sistema se identificaron los genes de polaridad celular *bazooka*, *par-6*, *big bang* o *CG6509* entre otros (Pinheiro and Montell, 2004; Aranjuez et al., 2012). Si bien esta estrategia permite identificar genes con relativa facilidad, tiene el inconveniente de que en algunos casos los RNAis generados no son eficaces a la hora de disminuir los niveles de expresión. El sistema GAL4/UAS también se ha utilizado en escrutinios de ganancia de función, donde se analiza si la sobreexpresión de un determinado gen en las BCs afecta a su migración. Así se identificó a Pvf1, un ligando de PVR, el cual cuando se sobreexpresaba en las células nutricias o en cualquier otra región de la cámara huevo producía un fenotipo de migración, lo que permitió su posterior caracterización como uno de los ligando de PVR implicado en migración de las BCs. De la misma manera se identificó a Upd, un ligando de la ruta de JAK/STAT, el cual expresado ectópicamente en FCs que no son BCs producía su transformación a BCs y una adquisición de la capacidad migratoria (Beccari et al., 2002).

Por otra parte, los escrutinios bioquímicos se han usado normalmente para identificar nuevos genes que interaccionan y participan en rutas específicas implicadas en la migración de las BCs. Entre las estrategias bioquímicas cabe destacar la técnica de doble híbrido en levaduras. En el caso concreto de la migración de las BCs, esta técnica se utilizó para el aislamiento de genes que podrían actuar corriente abajo de los RTKs EGFR/PVR durante el proceso de la migración de las BCs (Bianco et al., 2007). Sin embargo, una interacción física entre dos proteínas no se traduce siempre en una participación de ambas en el mismo proceso biológico, de hecho se puede dar el caso de que en algunos procesos actúen conjuntamente y en otros no. Por ello, una vez identificados los candidatos que interaccionan físicamente con EGFR/PVR se tiene que testar si éstos están implicados en el proceso de migración de las BCs. Este es el trabajo que hemos realizado en esta tesis donde hemos analizado unos cuantos candidatos del escrutinio de doble híbrido realizado por el Dr. Carlos M. Luque en el laboratorio de la Dra. Pernille Rorth, que usó como proteína cebo los dominios citoplasmáticos de PVR y EGFR y como proteínas presa proteínas obtenidas de una librería de cDNA (DNA copia) de *Drosophila*.

Nuestros resultados validan el uso de la técnica de doble híbrido en levaduras como estrategia para identificar nuevos genes implicados en la migración de las BCs, ya que de los cinco candidatos analizados al menos cuatro de ellos parecen estar requeridos en este proceso, CG33993, CG2887 y *vav*, además de la proteína relacionada con el citoesqueleto *coracle*. Comentar aquí que si bien los datos del silenciamiento con RNAi sugieren un papel de estos genes en la migración de las BCs, para corroborar esto habría que demostrar la eficacia específica de los RNAis. Además, respecto a los genes *Spt6* o *CG1135*, añadir que antes de poder concluir que no participan en el proceso de migración de las BCs habría que o bien testar que los RNAis para ambos genes son funcionales o bien generar BCs mutantes para alelos nulos de dichos genes y analizar si muestran algún defecto en la migración. Desafortunadamente no existen ni mutantes ni anticuerpos para estos genes. En la actualidad estamos generando sondas de RNA para todos los candidatos lo que nos permitirá analizar si se expresan

en las BCs y, si este fuera el caso, testar la eficacia del tratamiento con RNAi. A continuación se discutirán los resultados obtenidos de aquellos genes cuyos RNAs expresados en las BCs si producían un fenotipo de migración.

1. Coracle

El citoesqueleto de actina juega un papel esencial en las células migratorias ya que promueve la formación de protrusiones en el frente de migración y genera las fuerzas necesarias para el movimiento celular. La actina y las proteínas de unión a la actina se localizan en el frente celular para generar nuevos filamentos de actina o para reclutar proteínas necesarias para la migración (Ridley et al., 2003). Durante la migración de las BCs, hay una asimetría entre el frente de migración y la parte opuesta, acumulándose la actina en el frente del grupo en dirección a la migración (Verkhusha et al., 1999).

La proteína 4.1R, el homólogo en mamíferos de Coracle, se identificó como un componente mayoritario del citoesqueleto de eritrocitos (Marchesi, 1985). Ratones nulos para esta proteína mostraban eritrocitos con una morfología anormal, con poca estabilidad en la membrana y con una reducción de otras proteínas del citoesqueleto (Shi et al., 1999). Las proteínas de la familia 4.1 contienen un dominio FERM, dominio altamente conservado que permite la unión a proteínas de membrana y a lípidos, y un dominio SABD (spectrin-actin binding domain) que posee un sitio de unión a la actina y la espectrina (Chishtia et al., 1998; Correas et al., 1986). Por ello, se piensa que proteínas el con dominio FERM actúan como proteínas adaptadoras involucradas en el anclaje del citoesqueleto a la membrana. Si bien su papel como enlace con el citoesqueleto está bien establecido, su implicación en migración celular y su función en este proceso aún no está clara. Se ha observado que la proteína 4.1R se localiza en el frente de migración en queratinocitos y en células epiteliales en cultivo, donde se requiere para una correcta migración y direccionalidad (Chen et al., 2011; Ruiz-Sáenz et al., 2011). Aún más, en las células epiteliales se ha visto que interacciona y regula la localización de la proteína efectora de Rac1 y Cdc42, IQGAP1 (Ruiz-Sáenz et al., 2011). En *Drosophila*, Coracle se

requiere durante el cierre dorsal en las etapas embrionarias (Fehon et al., 1994). Interesantemente, en este organismo, *coracle* se identificó por su capacidad de suprimir el fenotipo de ojo causado por un alelo de ganancia de función del EGFR. Aún más, un análisis de secuencia de Coracle identificó tres sitios consenso de fosforilación por el EGFR, sugiriendo que Coracle podría ser fosforilada por este receptor y actuar corriente abajo del mismo (Fehon et al., 1994).

En nuestro trabajo hemos demostrado que la expresión del RNAi de *coracle* en las BCs resulta en un retraso en la migración. Además nuestros datos sugieren que existe una relación entre Coracle y el citoesqueleto de actina en las BCs, ya que, la expresión del RNAi de *coracle* produce una disminución de los niveles de la F-actina en el frente de migración. Esto concuerda con resultados obtenidos en ensayos de cicatrización donde se observa que hay una menor acumulación de F-actina y IQGAP1 en el frente de células que expresan siRNAs para 4.1R comparado con células control (Ruiz-Sáenz et al., 2011). Si bien, mientras que la proteína 4.1R se localiza en el frente de migración en células epiteliales (Ruiz-Sáenz et al., 2011), en las BCs Coracle no se encuentra localizada en el frente. De hecho, Coracle se localiza preferentemente en la mitad apico-lateral de las PCs que forman parte del grupo. Entonces, ¿cuál podría ser el papel de Coracle durante la migración de las BCs? Otra proteína que se expresa de manera similar a Coracle, o sea de forma polarizada en las PCs, y que se requiere para la migración de las BCs es la proteína de adhesión celular Fasciclin 2 (Fas2) (Szafranski and Goode, 2004). Sin embargo, y contrario a lo que ocurre con Coracle, eliminación de Fas2 en las BCs causa un incremento en su migración (Szafranski and Goode, 2004). Aún más, se ha observado que la generación de PCs mutantes para Fas2 resulta en una deslocalización de Dlg en las BCs (Szafranski and Goode, 2004), mientras que en nuestro caso la disminución de los niveles de Coracle no causa ningún efecto en la expresión y distribución de Dlg. La eliminación de Dlg también resulta en un aumento de la migración celular. Por todo esto, el modelo que se propone para el papel de Fas2 en la regulación de la migración de las BCs es que la señalización desde las PCs a través de Fas2 regula la distribución y

mantenimiento de Dlg en las BCs lo que a su vez regula la velocidad de migración inhibiéndola. En este contexto, Coracle podría actuar contrarrestando la función de Fas2 para así alcanzar una velocidad óptima. Estudios en células en cultivos han situado a Dlg corriente arriba de Coracle, ya que mutaciones en el gen *dlg* produce una interrupción de la expresión de Coracle (Woods et al., 1997). Si este fuera el caso en las BCs, podríamos contemplar un escenario en el cual Fas2 en PCs mantendría a Dlg lo que por una parte inhibiría la migración pero al mismo tiempo Dlg regularía a Coracle lo cual promovería la migración, estableciéndose así un bucle para un control fino de la migración celular.

Por otro lado, se ha visto que la proteína 4.1 interacciona con el complejo cadherina/ β -catenina. Aún más su eliminación en células en cultivo resulta en una disminución de los niveles de E-caderina y en una deslocalización de F-actina (Yang et al., 2009). Sin embargo, nuestros resultados muestran que la disminución en la expresión de Coracle no influye en la localización y/o expresión de la E-cadherina durante la migración de las BCs. Por último, se ha visto que IQGAP1, que interacciona con Coracle, interacciona con la proteína CLIP-170, proteína que se asocia a microtúbulos (Watanabe et al., 2004). Se ha visto que CLIP-170 se requiere para la polarización durante la migración celular en macrófagos en el embrión de *Drosophila* (Stramer et al., 2010). Así que otro posible papel para Coracle durante la migración de las BCs sería la de regular dinámica de microtúbulos durante la migración.

En resumen, nuestro trabajo identifica a Coracle como una proteína nueva involucrada en la migración de las BCs. También mostramos que Coracle regula el citoesqueleto de actina durante la migración y sugerimos que este papel lo puede realizar a través de las PCs, donde se localiza. Para discernir los mecanismos moleculares y celulares por los cuales Coracle regula la migración de las BCs sería interesante estudiar interacciones genéticas y moleculares entre Dlg y Fas2 y Coracle en BCs, y estudiar si los niveles de Coracle se ven afectados en BCs mutantes para *dlg* y *fas2*. Coracle posee varias isoformas, así que

también sería interesante analizar cual es la isoforma que se expresa en las PCs durante la migración ya que eso nos podría ayudar a entender su función.

2. CG2887

El gen CG2887 codifica para una proteína que contiene el dominio Dna J y cuyo ortólogo en humanos es DnaJB1. Proteínas que contienen este dominio actúan como co-chaperonas. El dominio J de las proteínas DnaJ interacciona con proteínas de choque térmico como la Hsp70 y regula su actividad ATPasa. Este dominio también interacciona con cadenas polipeptídicas no plegadas, “proteínas clientes” previniendo su agregación. El complejo DnaJ-proteína cliente se une a la proteína Hsp70 y a través del dominio J induce la hidrólisis de ATP y la interacción de la proteína cliente con la chaperona Hsp70 lo que promueve su plegamiento (Qiu et al., 2006). En un escrutinio de ganancia de función realizado en el laboratorio para identificar nuevos genes requeridos para la migración de las BCs, en el que se sobreexpresaron genes al azar en las BCs y se analizó su efecto en la migración se identificó otra proteína que contenía un dominio J, la proteína DnaJ-1, el homólogo en *Drosophila* de la co-chaperona humana Hsp40 (Cobrerros et al., 2008). Los experimentos demostraron que tanto la sobreexpresión de DnaJ-1 como de Hsp70 afectaba a la migración de las BCs. Aún más, la eliminación de los seis genes Hsp70 existentes en *Drosophila* también producía un retraso en la migración de las BCs (Cobrerros et al., 2008). Finalmente, experimentos usando la técnica de doble híbrido en levaduras demostraron que, al igual que CG2887, DnaJ-1 interacciona con el dominio citoplasmático de PVR (Cobrerros et al., 2008). Los resultados aquí presentados muestran que la expresión del RNAi de CG2887 produce defectos en la migración similares a los que se observan cuando se elimina Hsp70. Además, en ambos casos la expresión y distribución de DE-cad no se encuentran afectada. Sin embargo, mientras que la disminución de los niveles de CG2887 en las BCs resulta en una disminución en los niveles de F-actina, la alteración de los niveles de DnaJ-1 y Hsp70 producen una distribución anormal de la actina (Cobrerros et al., 2008). Esto sugiere que si bien CG2887 y DnaJ-1/Hsp70 interaccionan con PVR y parecen regular el citoesqueleto

de actina, esta función parece realizarse de forma distinta. Así, mientras que DnaJ-1 podría estar regulando la distribución de los filamentos de actina, CG2887 podría regular la formación o estabilización de dichos filamentos. Interesantemente, también se ha visto implicada la chaperona Hsp90 en la estabilización de los filamentos de actina mediante enlace cruzado con otra chaperona, Hsp100 (Koyasu et al., 1986). Finalmente, Hsp70 también se ha involucrado en la dinámica de actina asistiendo a la chaperona TriC en el plegamiento de cadenas de actina recientemente sintetizadas (Siegers et al., 2003). Estas funciones de Hsp70 podrían estar mediadas por CG2887. Un análisis más exhaustivo del fenotipo de la falta de función de CG2887, así como su interacción con proteínas Hsp70 nos ayudarán a dilucidar su función.

Por otra parte nuestros resultados demuestran que la expresión del RNAi de CG2887 en BCs resulta en una disminución de los niveles de la proteína de adhesión y polaridad celular Dlg. Aunque el papel de las proteínas chaperonas en migración celular aún no está muy estudiado, estudios recientes han demostrado que las proteínas Hsp70/Hsp90 juegan un papel importante en la migración de células endoteliales (Li et al., 2012). Aún más, Hsp70/Hsp90 se requieren para un establecimiento correcto de la polaridad celular en respuesta a un estímulo que promueve la migración. De forma que la expresión de shRNA para estos genes en células HUVECs resulta en una pérdida de la polaridad celular. Estos resultados apoyan los nuestros y revelan un nuevo papel de las proteínas chaperonas en el control de polaridad celular durante la migración. Sin embargo, nuestros resultados que muestran que la bajada de niveles de Dlg en BCs va acompañada de una disminución en su capacidad migratoria contradice en cierta manera resultados previos (Goode and Perrimon, 1997). Estos autores demostraron que si bien en BCs silvestres Dlg se acumula en las PCs y en el cortex de las BCs, en BCs mutantes para Fas2 los niveles de Dlg se mantienen en las PCs pero disminuyen considerablemente en el cortex de las BCs. Sin embargo, y contrario a lo que nosotros observamos en BCs que expresan el RNAi de CG2887, esta BCs mutantes para Fas2 migran más rápido. De hecho, en base a estos resultados y al hecho de que la eliminación de Dlg en FCs les confiere

un carácter invasivo se ha postulado que la función de Dlg en las BCs sería la de inhibir su migración. Una explicación posible para esta aparente discrepancia entre los resultados podría ser que mientras que en BCs mutantes para Fas2 la disminución de Dlg ocurre sólo en las BCs, en nuestro caso la disminución afecta a ambas PCs y BCs. En este contexto, Dlg podría tener un papel distinto en las PCs respecto a las BCs, de forma que en PCs promovería la migración mientras que en BCs la inhibiría. Un análisis más exhaustivo sobre el papel de CG2887 y Dlg en ambas poblaciones celulares nos ayudará a descifrar su función en la migración de las BCs. Por ejemplo sería interesante eliminar la función de ambos genes específicamente en PCs, BCs y en ambas a la vez y analizar las consecuencias en la migración del grupo.

3. CG33993

Lo único que se conoce de la proteína codificada por el gen CG33993 es que presenta un dominio SH2, siendo el resto de su estructura y función biológica desconocida. Estudios previos realizados en células de mamíferos en cultivo, determinaron que la función del dominio SH2 presente en ciertas moléculas es la de reconocer específicamente el estado fosforilado de los residuos tirosina. De hecho los dominios SH2 representan la mayor clase de dominios de reconocimiento de pTyr. La estructura del dominio SH2 contiene 2 hélices alfa y 7 láminas beta y reconoce tirosinas fosforiladas en un contexto de 3 a 6 aminoácidos adyacentes al carboxilo terminal de la tirosina fosforilada en la proteína diana. Este dominio está presente en moléculas adaptadoras, como GRB2/Drk, las cuales inician la formación de un complejo multiproteico transduccional alrededor de RTKs (Bar-sagi, 1994). De esta forma, se postula que los dominios SH2 sirven para conectar una proteína con otra. Adicionalmente, algunas proteínas con dominios SH2 tiene además dominios SH3 a través de los cuales se unen a otras proteínas, como es el caso de Vav (Bustelo, 1996). Por último, comentar que los dominios SH2 se encuentran en una gran variedad de proteínas que poseen otros dominios a través de los cuales regulan procesos muy diversos como regulación del citoesqueleto, ubiquitinación, transcripción, etc (Fig.37). De momento, el único dominio caracterizado que se ha encontrado en la proteína codificada por el gen CG33993 es el

SH2, pero no se puede descartar que contenga otros dominios que aunque no estuvieran tan conservados a nivel de aminoácidos sí podrían estarlo a nivel de función. Un análisis más exhaustivo de la estructura de la proteína nos dará más información sobre su posible función.

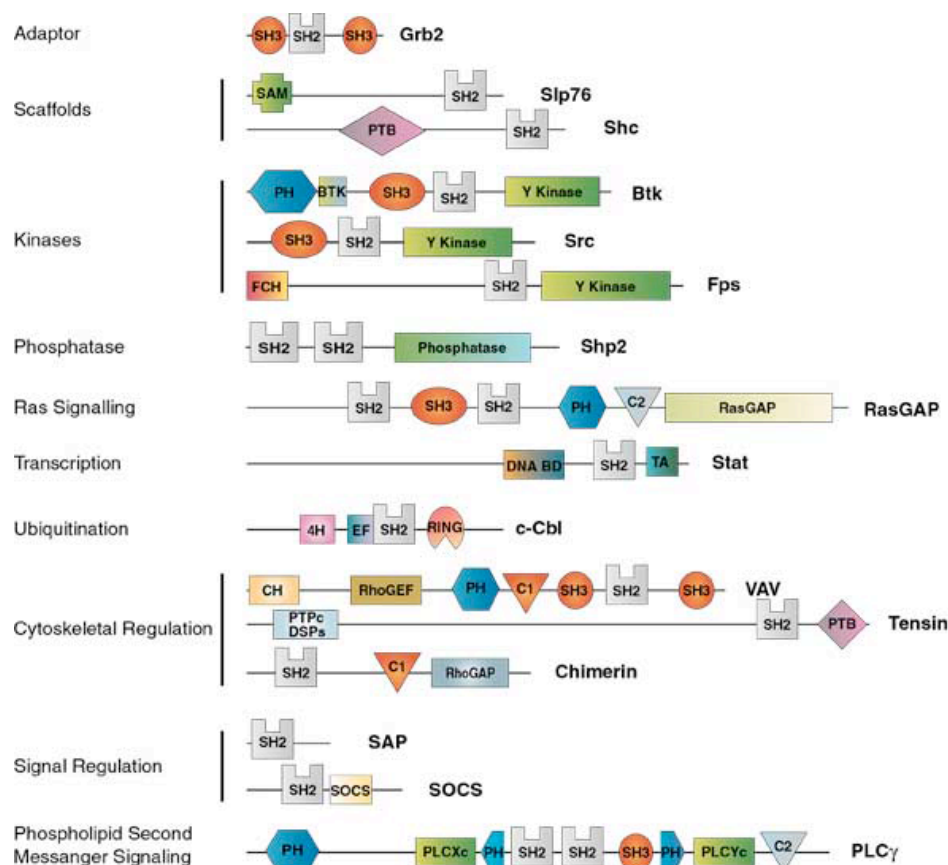


Figura 37.– Distintas proteínas que contienen el dominio SH2.

Los resultados aquí presentados muestran que la reducción de los niveles de CG33993 en las BCs produce un descenso de los niveles de F-actina. Este fenotipo no se debe a un descenso general en los niveles de transcripción ya que los niveles de *DE-cad* no se encuentran afectados. CG33993 podría regular los niveles de F-actina controlando su transcripción, polimerización y/o estabilización. Aunque no sabemos si la bajada de los niveles de actina es la causa del fenotipo de migración o una consecuencia, favorecemos la primera opción basándonos en el hecho de que una disminución en los niveles de

expresión en las BCs de proteínas reguladoras de los niveles de F-actin también causan defectos en la migración. Este es el caso de proteínas como Twinfilin, una proteína que secuestra los monómeros de actina y previene su ensamblaje en filamentos, ADF/cofilin, que promueve la depolimerización de F-actina (Wang et al., 2010), y Profilin, que promueve polimerización de actina⁸ (Verheyen and Cooley, 1994). Por último, añadir que existen resultados previos que apoyan la posibilidad de una modulación de F-actina corriente abajo de la vía de señalización del EGFR. Así, se ha visto que la señalización por EGFR incrementa la actividad de la F-actina de la proteína α -actinina expresada ectópicamente mediante enlace cruzado (Wahlström et al., 2006).

4. El papel de Vav en la migración celular

El primer miembro de la familia Vav fue identificado por S. Katzav y colegas en 1989 durante la búsqueda de oncogenes en tumores (Katzav et al., 1989). El nombre viene de la sexta letra del alfabeto hebreo, por ser el sexto oncogen identificado en ese laboratorio. Desde entonces, se han identificado miembros de la familia Vav en varios organismos, desde nematodos a mamíferos. Su papel fue inicialmente descrito en el sistema inmune, ya que la eliminación de Vav1 afecta a la correcta proliferación de los linfocitos debido a la ausencia de secreción de interleucina 2 (Bustelo, 2000; Turner and Billadeau, 2002). Sólo recientemente, mediante experimentos en cultivos celulares, se han implicado a estas proteínas en eventos de migración celular corriente abajo de factores que dirigen la migración. Interesantemente, distintos estudios sugieren que Vav puede tener tanto un papel activador como inhibidor de migración. Así, Vav se requiere en la quimiotaxis en macrófagos estimulados con el factor M-CSF (factor estimulador de colonias de macrófagos) (Vedham et al., 2005). De la misma manera, en linfocitos de la sangre periférica de humanos, Vav está implicada en la respuesta migratoria a la quimiocina del factor-1 derivado de las células del estroma (Vicente-Manzanares et al., 2005). En cambio, en células de Schwann, Vav2 se requiere para inhibir la migración corriente abajo del factor neurotrófico derivado del cerebro y la efrina A5 (Yamauchi et al., 2004; Afshari et al., 2010).

Sin embargo, aunque estos datos potencian la evidencia de que la familia de proteínas Vav puede regular la migración celular corriente abajo de moléculas implicadas en la quimiotaxis celular, la relevancia biológica para algunas de estas interacciones sigue siendo desconocida. Sólo en los últimos años, ha emergido el papel de Vav como un RhoGEF situado corriente abajo de RTKs en diversos procesos biológicos (Cowan et al., 2005; Hunter, 2006). Análisis en ratones nulos para Vav2 y Vav3 revelan defectos en las proyecciones axonales retinogeniculadas (Cowan et al., 2005) y en la migración inducida por la efrina A1 durante la angiogénesis (Hunter, 2006), sugiriendo un papel de Vav para dirigir la orientación axonal y angiogénesis corriente abajo de receptores de Eph *in vivo*. Si bien, debido a la dificultad de la observación *in vivo* de células en vertebrados, no está claro el mecanismo celular por el cual Vav regula la migración. En este trabajo hemos analizado el movimiento celular en su medio fisiológico, mostrando que Vav actúa corriente abajo de RTKs para promover la migración de las BCs durante el desarrollo del ovario de *Drosophila melanogaster in vivo*, controlando la dinámica de las proyecciones celulares mediante la regulación de la actividad de Rac1.

4.1 Mecanismos celulares por los cuales Vav regula la migración celular: dinámica de proyecciones

La migración celular esta asociada a la generación de protrusiones, como los lamelipodios, ricos en F-actina en el frente celular (Ridley et al., 1992; Nobes and Hall, 1995). La formación los lamelipodios depende de la activación de Rac1. Estudios previos han mostrado que la inhibición de la activación de Rac1 en fibroblastos en cultivo reduce la generación de proyecciones en el frente en experimentos de cicatrización, afectando severamente a los movimientos celulares (Nobes and Hall, 1999). Aún más, experimentos en BCs han mostrado que la activación de Rac1 en cualquier región del grupo genera proyecciones observándose además, una retracción de las proyecciones de los laterales y de la parte trasera del grupo, resultando en una polarización de las BCs y en un movimiento en la dirección donde Rac1 se encuentra más activado (Wang et al., 2010c). Debido a que Vav actúa como un Rac-GEF, podría estar regulando la formación de proyecciones en

células migratorias. Experimentos con células S2 de *Drosophila* mostraron que la expresión de una forma activa del Vav de *Drosophila* producía cambios en la forma celular y en la reorganización del citoesqueleto de actina que eran similares a los obtenidos cuando se expresaba una forma constitutivamente activa de Rac1, incluyendo la formación de lamelipodios (Hornstein et al., 2003), pero se desconoce si este hecho tiene lugar *in vivo*.

Nosotros mostramos el papel de Vav en el control del tamaño, estabilización y vida media de las proyecciones emitidas en el frente celular así como su implicación en el mantenimiento de la trayectoria y velocidad de migración de las BCs. Así, la expresión del RNAi de *vav* resulta en una disminución de la proyecciones emitidas en el frente a la vez que aumenta el número de proyecciones en otras direcciones. Además en estas proyecciones la vida media descende. Estos resultados demuestran que, al igual que Rac1, Vav se requiere para la polarización de las BCs mediante la regulación de la formación de proyecciones en el frente. Al mismo tiempo observamos un descenso de la velocidad de la migración de las BCs así como una trayectoria al azar. Esto se ha observado en estudios previos donde BCs que expresan formas dominantes negativas y RNAis para los RTKs EGFR y PVR muestran una reducción de la velocidad de migración hacia el oocito así como una reducción de las proyecciones emitidas en el frente (Poukkula et al., 2011). De hecho en este estudio se sugiere que Vav podría ser reclutada por los RTKs para que estos realicen su función en la polarización de emisión de proyecciones en el frente durante la migración de las BCs. Por otro lado, también se describió el papel del complejo activador de Rac1 Mbc/ELMO, como un regulador de las proyecciones emitidas en el frente de las BCs durante la migración (Poukkula et al., 2011).

Estos resultados sugieren que Vav podría estar regulando la formación de proyecciones en el frente de migración de las BCs a través de las rutas de los RTKs EGFR y PVR y la activación de Rac1.

4.2 Vav se requiere para la activación de Rac durante la migración de las BCs

Numerosos estudios bioquímicos han mostrado la interacción entre las proteínas Vav y la familia de las Rho GTPasas (Crespo et al., 1997; ver revisiones Bustelo, 2000, Bustelo, 2001 y Turner and Billadeau, 2002). Concretamente, Vav1 actúa regulando preferentemente a Rac1 (Crespo et al., 1997), mientras que Vav2 y Vav3 actuarían sobre todo activando a Rho (Movilla and Bustelo, 1999; Schuebel et al., 1998). Sin embargo, hay cierta controversia en su habilidad para activar a Cdc42 (Movilla et al., 2001).

Experimentos con células de mamíferos han demostrado que Vav1 está implicado en los cambios del citoesqueleto que contribuyen a modificaciones en la forma y en la migración de las células a través de su actividad como GEF para Rac1 (Fischer et al., 1998; Holsinger et al., 1998). Aún más, se ha visto en experimentos en células en cultivo de mamíferos que mutaciones en el dominio catalítico Dbl de Vav1, inhibe la activación de Rac1 además de bloquear la migración. Así como, la expresión de la forma constitutivamente activa de Vav1 induce la migración celular a través de la activación de Rac1 (Wilsbacher et al., 2006). Por otro lado, el incremento de la activación de Vav2 en células de mamíferos puede ser bloqueada por la expresión de la forma dominante negativa de Rac1 (Liu and Burridge, 2000). De la misma manera, los cambios producidos por la expresión de la forma activa de Vav en células S2 de *Drosophila* eran revertidos si al mismo tiempo se co-expresaba una forma dominante negativa de Rac, lo que sugería que Rac1 mediaba los efectos de la activación de Vav (Hornstein et al., 2003).

Por último, la implicación de Vav en la actividad de Rac en procesos de migración también se ha analizado durante el desarrollo. Así, estudios realizados en embriones de *Drosophila* muestran que la expresión de las formas activas de las proteínas Vav y Rac1 de *Drosophila* producían defectos similares en la migración de distintas poblaciones celulares (Couceiro et al., 2005). Estos datos apoyan nuestros resultados donde mostramos que la expresión de la forma constitutivamente activa de Vav

resulta en un bloqueo de la migración debido a la acumulación de F-actina alrededor de las BCs. Este resultado es similar al ocasionado por la activación de la forma constitutivamente activa de Rac1 como ya se mostró en trabajos de Ducheck y colegas en 2001.

Sin embargo, no se había medido aún directamente la activación de Rac1 debida a la actividad GEF de Vav. En este trabajo se mide por primera vez *in vivo* la actividad de Rac1 durante la migración de las BCs como resultado del papel Vav-GEF mediante la técnica de FRET. Mediante esta técnica mostramos que la expresión del RNAi de *vav* resulta en una disminución de la actividad de Rac1 en el frente del grupo de las BCs. Demostrando que Vav actúa localizando la activación de Rac1 en el frente. Esto concuerda con trabajos anteriores realizados en células PBL en cultivo, donde una forma constitutivamente activa de Vav muestra una activación de Rac1 de forma polarizada (Vicente-Manzanares et al., 2005).

Estos resultados demuestran que la proteína Vav está implicada en la localización de proyecciones en el frente de migración a través de la activación de Rac1.

4.3 Vav actúa corriente abajo de los RTKs PVR y EGFR

Estudios de co-inmunoprecipitación en células en cultivo han demostrado que las proteínas de mamíferos pertenecientes a la familia Vav se asocian a los receptores EGF y PDGF a través del dominio SH2 (Bustelo et al., 1992; Margolis et al., 1992; Katzav, 1993; Pandey et al., 2000; Tamás et al., 2003). Aún más, la asociación de Vav con estos receptores activados induce su activación por fosforilación en residuos de tirosinas (Bustelo, 1996; Liu and Burridge, 2000; Pandey et al., 2000). La capacidad de Vav de unirse a los RTKs a través de su dominio SH2 se encuentra conservada en *Drosophila* (Bianco et al., 2007). Así, experimentos en células S2 de *Drosophila* demostraron que la unión de Vav al EGFR resulta en aumento en su fosforilación (Hornstein et al., 2003). Además, en colaboración con el laboratorio de la Dra. Shulamit Katzav, hemos demostrado recientemente que la activación de PVR por su ligando Pvf1 en células S2 también induce un aumento de la

fosforilación de Vav (Fernández-Espartero et al., 2013). Todos estos resultados han llevado a proponer que Vav puede actuar como efector de la vía de señalización de RTKs en diversos procesos celulares. Recientemente está emergiendo su papel como efector de RTKs en migración celular. Los resultados aquí presentados muestran que 1) los fenotipos de la falta y ganancia de función de Vav son similares a aquellos de PVR/EGFR, 2) que tanto Vav como EGFR/PVR se requieren para la actividad de Rac1 y 3) que Vav y EGFR/PVR interaccionan genética y bioquímicamente. Estos resultados apoyan el papel de Vav corriente abajo de estos RTKs para mediar la migración dirigida de las células mediante la activación de Rac1 durante el desarrollo.

Sin embargo, Vav también podría desempeñar otras funciones corriente abajo de los RTKs. Así, estudios realizados en cultivos de neuronas, han demostrado que el papel principal de Vav2 durante la repulsión axonal en ratón es mediar la endocitosis de la efrina-Eph dependiente de Rac (Cowan et al., 2005). Aunque se ha demostrado que la endocitosis normalmente participa atenuando la señalización de los RTKs, en BCs se ha propuesto que podría asegurar el reciclaje de los RTKs en las regiones de mayor señalización, promoviendo así el movimiento dirigido de las BCs (Jékely et al., 2005). Esto se basa en el hecho de que la eliminación en BCs de la ubiquitin ligasa Cbl, un regulador de la endocitosis de los RTKs, conduce a la deslocalización de la señal y defectos en la migración. En este contexto, otra posible función de Vav corriente abajo de EGFR/PVR durante la migración celular podría ser la de mediar la correcta endocitosis de los RTKs, como en el caso de la repulsión axonal, lo que a su vez aseguraría unos niveles correctos de actividad de Rac1. En el futuro sería interesante analizar el efecto de la actividad de Vav en la distribución y actividad de los RTKs durante el proceso de migración.

4.4 Vav y otros GEFs

La migración de las BCs es un proceso complejo y probablemente requiera de la activación de distintos GEFs corriente debajo de los RTKs para regular los distintos cambios en el citoesqueleto de actina necesarios para llevar a cabo este proceso. Además, la falta de función

de ambos EGFR y PVR en BCs resulta en defectos en la migración que son mayores que los observados cuando se elimina la función de Vav. Por ello, hipotetizamos que otros GEFs además de Vav podrían mediar aspectos de la función de Rac1 corriente abajo de PVR y EGFR. Análisis previos han implicado a otro GEF de Rac1, Mbc, y a su cofactor Elmo en la migración de las BCs (Bianco et al., 2007; Duchek et al., 2001). Además, la eliminación de *mbc* es capaz de atenuar los defectos en morfología celular y acumulación de F-actin que se producen en las células foliculares debido a la activación ectópica de PVR. Estos resultados han llevado a proponer que Mbc podría actuar como regulador de Rac1 corriente abajo de PVR (Duchek et al., 2001). Aunque experimentos en células en cultivo han demostrado que Mbc, sin poseer el dominio de homología Dbl característico de los Rac-GEF, puede mediar la unión directa entre el GTP y Rac1 y promover su activación (Brugnera et al., 2002), aún está por demostrar en papel para Mbc como Rac-GEF durante la migración de las BCs. En este trabajo, nosotros hemos encontrado que la reducción de los niveles de expresión de Mbc o ELMO en las BCs incrementan el fenotipo de migración debido a la reducción en los niveles de Vav. Ya que en ningún caso eliminamos totalmente la función de estos GEFs en las BCs, contemplamos al menos dos posibles escenarios para explicar esta interacción genética y las funciones de ambos durante la migración de las BCs (Fig.38 B). Por un lado, estas dos proteínas podrían actuar de forma independiente y sinérgica como GEFs para mediar la activación de Rac1 a un nivel y/o localización específicos. Por otro lado, experimentos en cultivos celulares han mostrado que la expresión de DOCK180, homólogo de Mbc en mamíferos, incrementa la actividad de Vav para la activación de Rac (Kiyokawa et al., 1998). De este modo, Mbc podría interaccionar con Vav a través de sus dominios SH3 y actuar como un coactivador y/o potenciador de Vav. Asimismo, se ha visto que aunque las proteínas Vav funcionan directamente como GEFs, también pueden, a través de los dominios SH2/SH3, favorecer la unión de otras proteínas específicos de Rac, actuando así como proteínas adaptadoras (Bustelo, 2001). En este contexto, Vav podría potenciar la actividad de otros GEFs como Mbc u otros aún por determinar. En el futuro, sería interesante validar la

función de Mbc como GEF para Rac1 en BCs y testar si Mbc puede interaccionar físicamente con Vav.

Experimentos previos en nuestro laboratorio han demostrado que Vav coopera con otros dos GEFs, Sos y Trio, para regular la migración y el crecimiento de axones durante el desarrollo del sistema nervioso embrionario de *Drosophila* (Malartre et al., 2010). Ambos GEFs poseen el dominio Dbl característico de los GEFs específicos de Rac1 (Bellanger et al., 1998; Nimnual et al., 1998). Además, estudios en células en cultivo de mamíferos mostraron que Sos actuaba como GEF tanto de Rac como de Ras, bajo la activación de receptores tirosina kinasas (Nimnual et al., 1998; Nimnual and Bar-Sagi, 2002). Por todo ello, ambos podrían cooperar con Vav durante la migración de las BCs. En este trabajo demostramos que, al contrario de lo que ocurre con *mbc* y *elmo*, la reducción de los niveles de *trio* en las BCs no afectaba a su migración. Si bien estos datos no son del todo concluyentes, ya que en muy pocos casos conseguimos eliminar *trio* de todas las BCs y no hemos testado la eficacia del RNAi de *trio*, al menos sugieren que la función de *trio* no es totalmente esencial. Por otra parte, nuestros datos muestran que la disminución de la expresión de *trio* aumenta los defectos en la migración debidos a la ausencia de *vav*, sugiriendo que *trio* podría en cierta manera cooperar con Vav para llevar a cabo esta función. La implicación de *sos* en la migración de las BCs está pendiente de o bien determinar la eficacia de la expresión del RNAi de *sos* en las BCs o de generar BCs mutantes para un alelo nulo de *sos*, lo que requiere del aislamiento de mutantes para *sos* en cromosomas FRT.

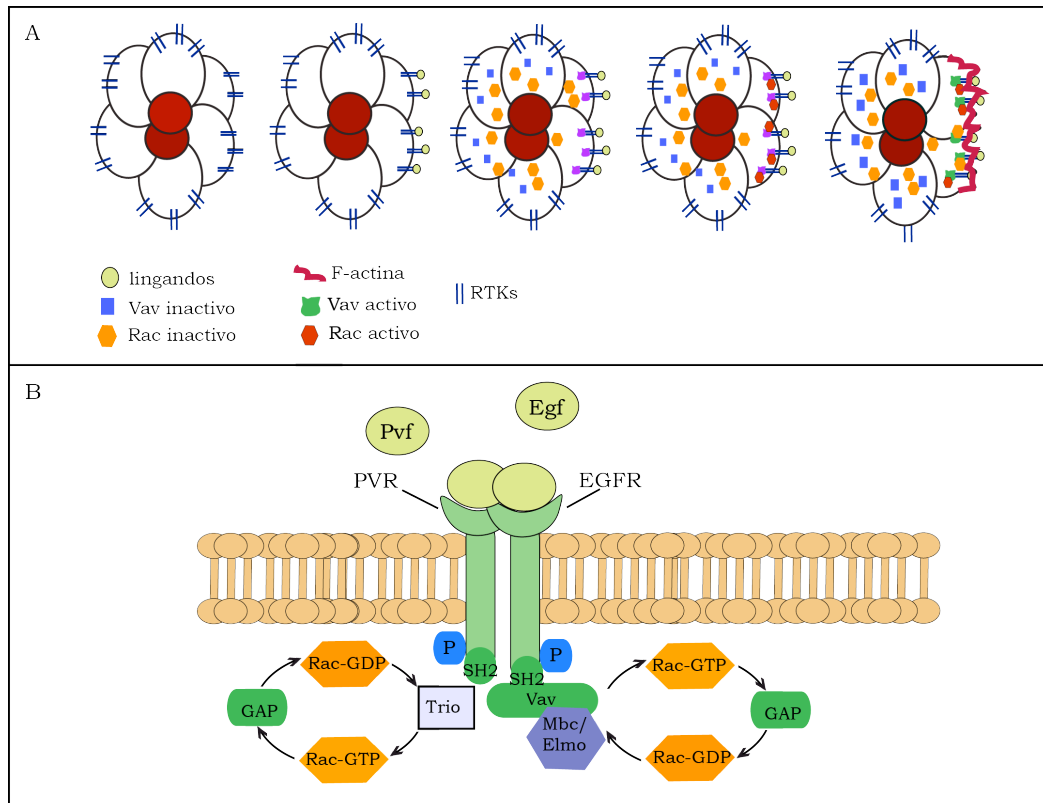


Figura 38.- Modelos de la hipótesis.

(A) Esquema del mecanismo de migración de las BCs donde los ligandos activan a los RTKs y generan proyecciones en el frente de las BCs a través de la activación de Vav y Rac. B) Esquema del mecanismo de activación de Rac donde intervienen tanto Vav como otros GEFs.

En resumen nuestro trabajo demuestra que Vav actúa corriente abajo de RTKs para controlar la migración dirigida un ejemplo de migración durante el desarrollo, la migración de las células del borde del ovario de *Drosophila*. Más aún, nosotros describimos el mecanismo celular y molecular por el cual Vav regula esta migración y proponemos el siguiente modelo. La unión de los ligandos PDGF/EGF, secretados por el oocito, a su receptores EGFR/PDGFR los activaría en el frente de migración, lo cual induciría el reclutamiento de Vav y su activación mediante fosforilación. Este hecho llevaría a un incremento de la actividad de Rac1 en el frente de las células migratorias, lo cual promovería la estabilización y crecimiento de las proyecciones en el frente, controlando así esta migración celular dirigida. La regulación de la señalización de Vav corriente abajo de RTKs puede participar no solo en procesos de migración que tienen lugar durante el desarrollo o en

situaciones fisiológicas normales, sino también en tumorigénesis (Billadeau, 2002; (Billadeau, 2002). Así, se han encontrado defectos en la expresión de Vav1 en el 53% de los adenocarcinomas ductales pancreáticos (Fernandez-Zapico et al., 2005). Además, Vav2 y Vav3 se han relacionado con el crecimiento de tumores, neoangiogénesis y metástasis en cáncer de mama (Citterio et al., 2012). Finalmente, Vav3 está sobreexpresado en leucemia, cáncer de hueso y cáncer gástrico así como en procesos metastáticos (Chang et al., 2012; Lin et al., 2012a; Lin et al., 2012b). Por esta razón, comprender los mecanismos por los cuales Vav regula migración celular es relevante no sólo a la hora de entender el desarrollo sino también la biología de los tumores. De esta manera, en el futuro esto podría ayudar a encontrar posibles tratamientos contra el desarrollo de tumores y metástasis.

Conclusiones

1. Coracle, el homólogo en *Drosophila* de la proteína 4.1 de mamíferos, se localiza en una región apico-lateral de las células polares que forman parte del grupo de las células del borde del ovario de *Drosophila*. Esta localización se mantiene desde un estadio 8, donde se forma el grupo de las células del borde, hasta un estadio 10, cuando las células del borde contactan con el oocito.
2. La proteína Coracle se requiere para la migración de las células del borde de *Drosophila*. La disminución de los niveles de Coracle en las células del borde resulta en una disminución de los niveles de F-actina en el frente de migración, sin embargo no causa ningún efecto en la expresión de proteínas de adhesión o polaridad como DE-Cadherina y Discs large.
3. La expresión de un RNAi para el gen *CG2887* en las células del borde del ovario de *Drosophila* produce un retraso en su migración y una fuerte disminución de los niveles de F-actina y Discs large en las células del borde.
4. La expresión de un RNAi para el gen *CG33993* resulta en una disminución de la migración de las células del borde del ovario de *Drosophila* y de los niveles de F-actina y Discs large.
5. El gen *vav* es fundamental para la correcta migración de las células del borde del ovario de *Drosophila*. Tanto su falta de función como su sobre-activación afecta a la distribución de F-actina y disminuye la capacidad migratoria de las células del borde de *Drosophila*.
6. Vav regula la correcta distribución de las proyecciones en el grupo de las células del borde y la estabilidad y tamaño de las proyecciones emitidas en el frente de migración. Asimismo, Vav determina la trayectoria lineal de las células del borde hacia el oocito y la velocidad de migración de las mismas.
7. Vav se localiza preferentemente en las proyecciones de las células del borde de *Drosophila* durante su migración.

8. Vav se requiere para la activación polarizada de Rac1 en el frente de migración.

9. Vav interacciona genéticamente con los receptores tirosina kinasas EGFR y PVR durante la migración de las células del borde.

10. La disminución de los niveles de expresión del complejo activador de Rac1 Mbc/ELMO y el Rac-GEF Trio, incrementan el fenotipo de migración de las células del borde de *Drosophila* obtenido tras la disminución de los niveles de Vav. Estos resultados sugieren que estos tres GEFs podrían cooperar en este proceso de migración.

Material y Métodos

1. 1. Genética de moscas

1.1. Cepas

En esta tesis se usaron las siguientes cepas de moscas: *yw*;e22c-GAL4-UAS.flp/CyO, *slbo*-GAL4-UAS.moesin::GFP/CyO, *wc306*-GAL4, *hsFLP122*-UbiGFPnls-FRT19A, *yhsflp*;UbiGFP-FRT40A/(CyO), *w*;UbiGFPnls-FRT42D/CyO, *yw*;;*trio*^(1,2,3)FRT2A/TM6B, UbiGFPnls.FRT2A y *w*;UAS.Rac1^{v12} (Bloomington Stock Centre), UAS.EGFR^{DN}/TM6 (O'Keefe et al., 1997), UAS.PVR^{DN}/CyO, *w*;;UAS.λmycPVR/TM3 y *pvr¹*FRT40A/CyO (Duchek et al., 2001), *w*;;*sos*^{e2H}/CyOWgB y *w*;;*sos*^{e4G}/CyOWgB (cedidos por el laboratorio del Dr. Long Yan), UAS.RNAi de *vav*, *coracle*, CG2887, CG33993, CG1135, *Spt6*, *trio*, *sos*, *mbc* y *elmo* de Vienna Stock Center (VDRC), *vav*FRT19A/FM7 (Kyoto), *vav*²⁵FRT19A/FM7 (Malartre et al., 2010), UAS.Vav^{act} (Couceiro et al., 2005), UAS.RacFRET (Wang et al., 2010c) y FasIII::GFP (FlyTrap Database).

Para el análisis de las interacciones genéticas se generaron las siguientes líneas: *vav*²⁵FRT19A/FM7;*pvr¹*FRT40A/CyO, *vav*²⁵FRT19A/FM7;EGFR FRT42D/CyO, *vav*²⁵FRT19A/FMZ;;UAS.PVR^{DN}/TM6B, *vav*²⁵FRT19A/FMZ;;UAS.EGFR^{DN}/TM6B, *whsflp*-UbiGFPnls-FRT19A/FMZ;UbiGFPFRT40A/CyO, *whsflp*-UbiGFPnls-FRT19A;UbiGFP-FRT42D/CyO, *whsflp*-UbiGFPnls-FRT19A;*slbo*-GAL4-UAS.moesinGFP/CyO, *vav*²⁵FRT19A/FMZ;;*trio*^(1,2,3)FRT2A/TM6B, *whsflp*-UbiGFPnls-FRT19A;UbiGFP-FRT2A/TM6B, UAS.*vav*RNAi;;UAS.*vav*RNAi, UAS.*vav*RNAi;;UAS.*mbc*RNAi, UAS.*vav*RNAi;;UAS.*elmo*RNAi, UAS.*vav*RNAi;;UAS.*trio*RNAi, UAS.*vav*RNAi; *sos*^{e2H} y UAS.*vav*RNAi;*sos*^{e4G}.

1.2. Generación de clones mitóticos

Los clones mitóticos fueron generados mediante el sistema FLP/FRT (Chou and Perrimon, 1992). Este sistema se basa en la capacidad que posee la enzima flipasa (FLP), para inducir recombinación entre cromosomas homólogos que contienen secuencias FRT, una secuencia

de reconocimiento de la flipasa. Para la obtención de células mutantes para un gen, se parte de hembras adultas heterocigóticas para la mutación. Dichas hembras contienen en una cromátida la mutación junto con la secuencia FRT y en la cromátida hermana la secuencia FRT con un marcador. Una vez que la flipasa activa a los FRT, se produce la recombinación entre las cromátidas hermanas y la replicación de las mismas. Tras la mitosis se obtienen células hijas con distinta composición cromosómica: células homocigóticas para la mutación, células heterocigóticas para la mutación y células homocigóticas silvestres (Fig.39 A).

Durante este trabajo, la FLP se activó específicamente en las células foliculares usando el sistema GAL4 y la línea e22c-GAL4 (Duffy et al., 1998) o bien mediante choque térmico usando cromosomas que contenían una heat-shock flipasa (hs-flp) . Los clones mutantes fueron identificados por la ausencia del marcador fluorescente celular ***Green Fluorescence Protein*** (GFP).

Para la generación de clones en las BCs mediante activación de la enzima hs-flp, el choque térmico se llevó a cabo en larva y en adulto. Se indujo la recombinación en larvas de estadio L2 mediante choque térmico en baño a 37°C durante 1 hora, tras lo cual se mantuvieron a 25°C. Una vez eclosionaron las hembras de la descendencia se mantuvieron con levadura fresca a 25°C para estimular la oogénesis durante dos días. Tras estos dos días se procedió a la activación de la recombinación sometiendo a las hembras adultas a dos choques térmicos de 1 hora cada uno a 37°C con un descanso de 1 hora entre las dos etapas de choque térmico. Se volvieron a mantener con levadura fresca a 25°C durante dos días, tras los cuales se procedió a su disección.

1.3. Expresión de RNA interferente

Para dirigir la expresión de genes transgénicos se utilizó el sistema GAL4/UAS. Este sistema consiste en el uso del factor de transcripción GAL4 de levaduras situado corriente abajo de un promotor específico de célula o tejido. Este factor de transcripción permite la expresión

ectópica de genes en dichas células o tejidos debido a la localización de una secuencia diana del factor GAL4 denominada UAS (Upstream Activation Sequences) situada corriente arriba del gen de interés (Fig.39 B).

Mediante este sistema también se puede dirigir la expresión de RNA interferentes (RNAi) que inhiben o disminuyen la expresión de genes específicos. Los RNAi generan RNAs de doble cadena, los cuales son fragmentados mediante la enzima Dicer que contiene el propio organismo. Estos fragmentos de doble cadena son desnaturalizados generándose RNAs de cadena sencilla complementarios al RNA mensajero de interés, de manera que generará RNA de doble cadena junto con el RNA mensajero resultando en un bloqueo de la transducción a proteínas.

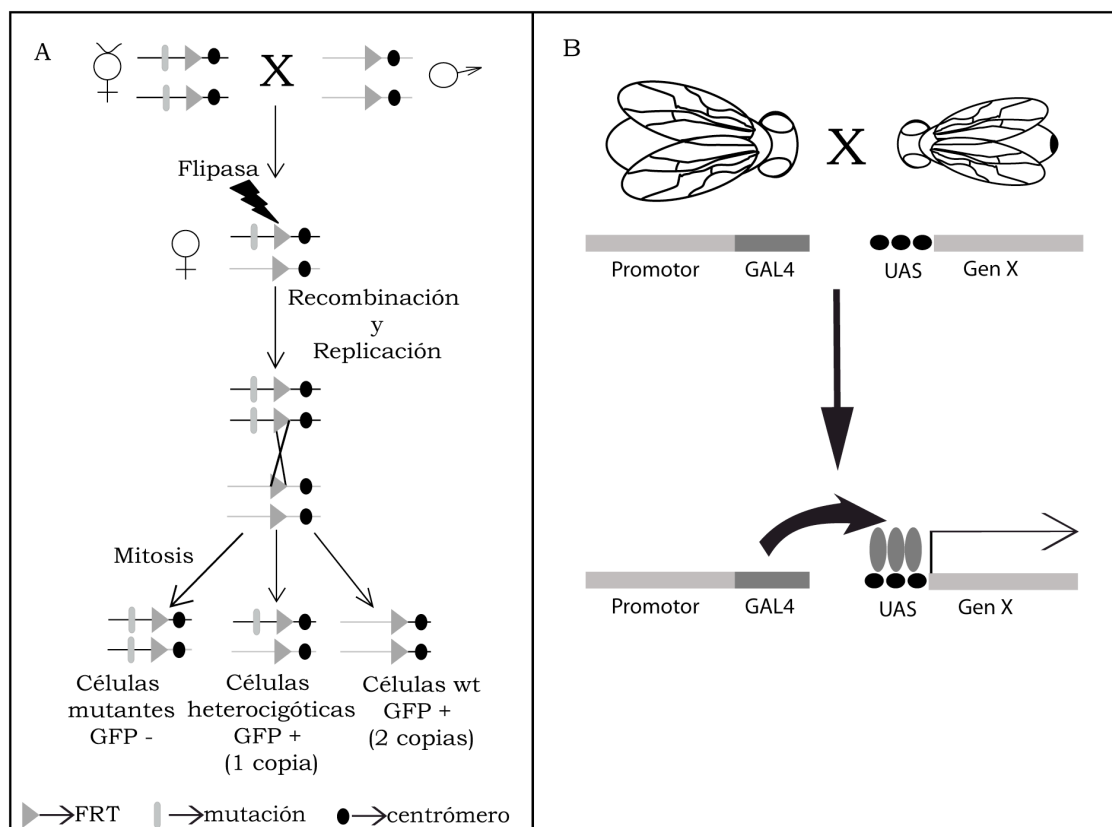


Figura 39.- Esquema de los sistemas utilizados para los estudios de falta de función.

(A) Sistema FLP/FRT por el cual obtenemos un organismo mosaico con células silvestres, células heterocigóticas para la mutación y homocigóticas para la mutación. (B) Sistema GAL/UAS por el cual se dirige la expresión de la secuencia UAS a través del promotor GAL4.

2. Inmunohistoquímica y microscopía

Las hembras adultas se mantuvieron dos días en levadura fresca a 25°C previamente a la disección. La disección se realizó en PBT¹ utilizando pinzas de disección. Una vez extraídos los ovarios se fijaron en PFA 4%² durante 20 minutos. Para eliminar los restos de fijador se lavó la muestra con PBT 15 minutos. Tras el lavado del fijador se procedió a bloquear la muestra con PBT10³ durante 1 hora. Una vez bloqueada, se añadió el anticuerpo primario diluido en PBT1⁴ y se incubó durante toda la noche. Tras la incubación con el anticuerpo primario se procedió a un lavado en PBT1 de 1 hora y posterior incubación con anticuerpo secundario diluido en PBT0,1⁵ de 1 a 4 horas. Se continuó con un lavado en PBT de 30 minutos y una posterior incubación con el marcador de DNA TO-PRO-3 (Molecular Probes™, dilución 1/1000 en PBT) durante 10 minutos. Para el marcaje de la actina, la muestra se incubó durante 20 minutos con rhodamine-phalloidin (Molecular Probes™, 1/200). A continuación se realizó un último lavado en PBT 20 minutos antes de montar la muestra en Vectashield. Todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente y en agitación. Los anticuerpos primarios usados fueron los siguientes: conejo anti-GFP 1/10000 (Molecular Probes™), ratón anti-GFP 1/100 (Molecular Probes™), rata anti-DEcad2 1/10000 (Hybridoma bank), ratón anti-Disc large 1/100, ratón anti-Coracle 1/5000 (Hybridoma bank) y rata anti-HA 1/10000 (Hybridoma bank). Los anticuerpos secundarios Alexa Fluor® 488 y Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) se utilizaron en una concentración 1/200.

Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal SP2 de Leica y analizadas con Image 64J y PhotoShop CS4.

¹ PBT.- Solución salina de tampón fosfato suplementada con Tween20 al 1%.

² PFA 4%.- Paraformaldehído diluido en PBT.

³ PBT10.- PBT suplementado con BSA (*Bobine serum albumina*) al 10%.

⁴ PBT1.- PBT suplementado con BSA (*Bobine serum albumina*) al 1%.

⁵ PBT0,1.- PBT suplementado con BSA (*Bobine serum albumina*) al 0,1%.

3. Cultivo de ovarios y adquisición de imágenes *in vivo*

Los ovarios de *Drosophila* se diseccionaron e incubaron en medio de cultivo Schneider suplementado con un 10% de suero fetal bovino (F3018; Sigma), 0,6X penicilina/estreptomicina (GIBCO) y 0,20 mg/ml de insulina (I550; Sigma). Se ajustó el pH a 6,9. Para marcar las membranas celulares y observar la posible degradación del huevo se utilizó el colorante vital FM4.64 a una concentración 10 μ M. La muestra se colocó en una placa Petriperm (Sigma), la cual contiene una membrana que permite el intercambio de gases.

Los ovarios fueron extraídos del abdomen de dos moscas adultas de entre 2 y 4 días post-eclosión, en el medio de cultivo. Una vez los ovarios fueron aislados, se procedió a separar las ovariolas de la envoltura muscular, sujetando con pinzas los huevos opacos de mayor tamaño, y separando el resto de huevos de distintos estadios de desarrollo tirando del extremo, donde se encuentra el germario (Fig.40). Una vez separadas las ovariolas, se eliminaron los huevos de gran tamaño. En la placa Petriperm se colocó un puente compuesto por dos mitades de un cubreobjetos de 22X22mm. Entre el puente se colocó unos 15 μ l del medio de cultivo con las ovariolas, y se cubrió la muestra con un cubreobjetos de 22X22mm. Para evitar la evaporación del medio durante la adquisición de las imágenes se sellaron los laterales con aceite Halocarbon 27 (Sigma) (Fig.41).

Las imágenes fueron adquiridas a partir de huevos de estadio 9 a temperatura ambiente (entre 23°C y 25°C). Se utilizó un microscopio confocal SP5 tomando series en Z para evitar la pérdida de las BCs durante la adquisición y un microscopio Zeiss Axioplan 2 con una exposición no superior a 200 ms, donde el enfoque se realizó manualmente de forma frecuente. En ambos casos la imagen fue tomada cada 2 minutos en un tiempo total de 5 horas aproximadamente.

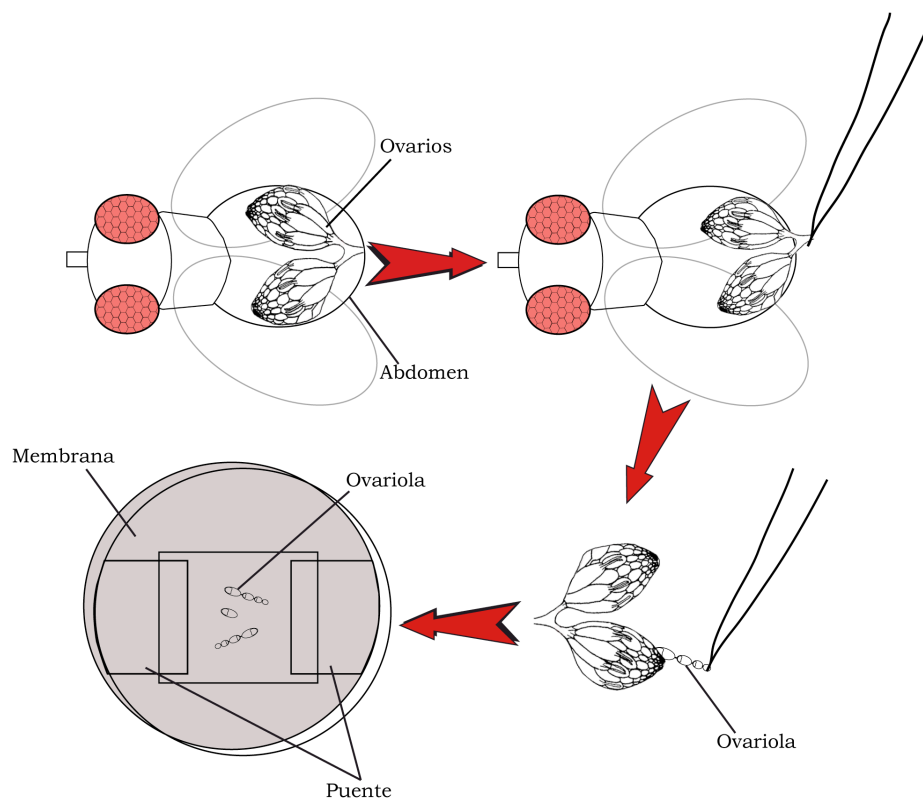


Figura 40.- Esquema de disección de ovarios para estudios *in vivo*.

4. Procesamiento de las imágenes *in vivo*.

4.1. Cuantificación de las proyecciones

El análisis de las proyecciones fueron realizadas de forma manual con el programa ImageJ sobre las películas realizadas a partir de cultivos de ovarios. Para identificar las proyecciones se delimitó con una línea el contorno del grupo de las células del borde y se consideraron proyecciones a las extensiones emitidas a partir de la línea, con una anchura menor que la de una célula. Las proyecciones se cuantificaron en un total de entre 6 y 7 cámaras huevos distintas para la situación control y la mutante.

Para el estudio de la distribución y orientación de las proyecciones se superpuso un diagrama radial, dividido en distintas las regiones del frente (0° - 45° y 315° - 0°), los laterales ($>225^{\circ}$ a $<315^{\circ}$ y $>45^{\circ}$ a $<315^{\circ}$) y la parte trasera (135° - 225°), sobre las imágenes de las BCs obtenidas a

partir de las películas (Fig.41 A). Así se observó la región en la que se localizaban las proyecciones siendo el ángulo de emisión relativo al eje X-Y.

La medición de la longitud de las proyecciones en el frente se realizó de forma manual. Se midió la longitud de una línea que iba desde el límite del grupo de las BCs hasta el final de la proyección frontal.

Para medir la vida media de las proyecciones se calculó el tiempo desde que una proyección aparece por primera vez hasta que desaparece.

4.2 Estudio de la velocidad y distancia (Tracking)

Para el estudio de la trayectoria, distancia y velocidad de la migración se utilizó el plugin Manual-Track de ImageJ. El estudio se realizó en las dos fases de la migración de las BCs descritas por Poukkula et al., 2011, considerando la fase temprana cuando las BCs se localizan entre la región anterior de la cámara huevo hasta la mitad de la distancia al oocito, y la fase tardía cuando las BCs son localizadas entre la mitad de la distancia al oocito y la membrana anterior de este. La trayectoria, distancia y velocidad se midieron marcando el centro del grupo de las BCs en cada punto de tiempo (Fig.41 B). El programa Manual-Track, mostraba finalmente la línea de la trayectoria que seguían las BCs, siendo analizados un total de 20 casos entre las dos situaciones, control y experimental. En el caso de la distancia y la velocidad, se representaron la media de los totales en un gráfico de barras, donde se representaron los errores estándar de la media (SEM). Se realizó un análisis estadístico siguiendo una t-student considerando que los datos eran estadísticamente significativos siempre que se obtuviera un $p\text{-valor} < 0.05$.

La cuantificación correspondiente con la fase temprana de migración y la tardía, se llevaron a cabo en películas de aproximadamente 1 hora y 45 minutos de duración. Las imágenes fueron adquiridas cada 2 minutos.

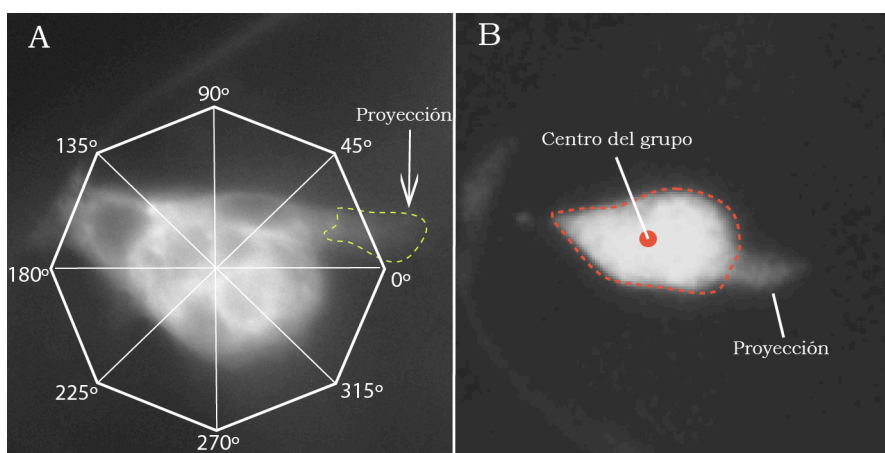


Figura 41.- Esquema de medición de proyecciones.

(A) Esquema radial superpuesto en un grupo de BCs para el estudio de la distribución de las proyecciones. (B) Esquema mostrando el centro del grupo de las BCs para realizar el tracking.

6. Análisis de FRET

La técnica de FRET (Förster Resonance Energy Transfer) fue descrita como un mecanismo de transferencia de energía entre dos cromóforos, mediante el cual un cromóforo donador es excitado transfiriendo la energía a un cromóforo aceptor. Esto tiene lugar debido a que el espectro de absorción del aceptor solapa con el espectro de emisión del donador lo cual ocurre únicamente cuando la distancia entre las dos moléculas no supera los 100 Angstrom. En biología, el FRET es una herramienta muy útil para el estudio de la dinámica proteica y de interacciones proteína-proteína o proteína-DNA, entre otras. Para medir la eficiencia del FRET se usa habitualmente fluoróforos que puedan ser detectados por microscopios de fluorescencia.

En este trabajo utilizamos moscas transgénicas que contienen la construcción UAS-RacFRET. Esta construcción tiene por una parte la proteína Rac1 unida al fluorocromo CFP y por otra un dominio de reconocimiento de la proteína Rac1 activa (PBD) unido al fluorocromo YFP. Cuando Rac1 se encuentra en su conformación inactiva, unida a GDP, el fluorocromo detectado en mayor medida por el microscopio es el CFP. Sin embargo, cuando la proteína Rac1 se encuentra en su conformación activa, unida a GTP, el dominio PBD se une a Rac1 y el fluorocromo detectado en mayor medida es el YFP (Fig.29). La presencia

de la secuencia UAS permite dirigir la expresión de RacFRET en las células de estudio, en nuestro caso las BCs, mediante la técnica GAL4/UAS. De esta manera se puede detectar la activación de Rac1 en las BCs mediante la detección de fluorocromos.

Las imágenes de FRET de cámaras huevo fijadas fueron adquiridas con un microscopio Zeiss LSM510 equipado con un objetivo de inmersión 40X/1.3 oil. El ratio entre la señal YFP/CFP se obtuvo con Metamorph y se representó usando un código de color comprendido por ocho colores. Las mediciones de las medias del FRET indexado en todo el grupo de las BCs se calcularon a partir de imágenes a las que se les realizó una sustracción del fondo, a las cuales se les aplicó un threshold y se convirtieron a máscaras binarias con un valor de fondo igual a cero. Luego se midieron la media de las intensidades de fluorescencia de la célula (CFP y YFP) y se calcularon los cocientes YFP/CFP. Para determinar el frente y la parte trasera del grupo de las BCs se superpuso el diagrama radial utilizado anteriormente. El ángulo 0° indica el frente de migración. Para la medición de las señales de CFP y YFP de las áreas del frente y la parte trasera se tuvieron en cuenta solo las regiones localizadas entre 45° y 315° y entre 135° y 225° respectivamente.

Bibliografia

- Acloque, H., Adams, M. S., Fishwick, K., Bronner-fraser, M., and Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *The Journal of Clinical Investigation* 119.
- Afshari, F. T., Kwok, J. C., and Fawcett, J. W. (2010). Astrocyte-produced ephrins inhibit schwann cell migration via VAV2 signaling. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 4246–4255.
- Anand-Apte, B., Zetter, B. R., Viswanathan, a, Qiu, R. G., Chen, J., Ruggieri, R., and Symons, M. (1997). Platelet-derived growth factor and fibronectin-stimulated migration are differentially regulated by the Rac and extracellular signal-regulated kinase pathways. *The Journal of biological chemistry* 272, 30688–30692.
- Aranjuez, G., Kudlaty, E., Longworth, M. S., and McDonald, J. a (2012). On the role of PDZ domain-encoding genes in *Drosophila* border cell migration. *G3* 2, 1379–1391.
- Aronheim, a, Engelberg, D., Li, N., al-Alawi, N., Schlessinger, J., and Karin, M. (1994). Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway. *Cell* 78, 949–961.
- Bai, J., Uehara, Y., and Montell, D. J. (2000). Regulation of invasive cell behavior by taiman, a *Drosophila* protein related to AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast cancer. *Cell* 103, 1047–1058.
- Bar-sagi, D. (1994). The SOS (Son of sevenless) Protein. *Science* 5, 165–169.
- Barrallo-Gimeno, A., and Nieto, M. A. (2005). The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 132, 3151–3161.
- Barrett, K., Leptin, M., and Settleman, J. (1997). The Rho GTPase and a putative RhoGEF mediate a signaling pathway for the cell shape changes in *Drosophila* gastrulation. *Cell* 91, 905–915.
- Batlle, E., Sancho, E., Francí, C., Domínguez, D., Monfar, M., Baulida, J., and García De Herreros, a (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nature cell biology* 2, 84–89.
- Beccari, S., Teixeira, L., and Rørth, P. (2002). The JAK/STAT pathway is required for border cell migration during *Drosophila* oogenesis. *Mechanisms of development* 111, 115–123.
- Bellanger, J. M., Lazaro, J. B., Diriong, S., Fernandez, a, Lamb, N., and Debant, a (1998). The two guanine nucleotide exchange factor domains of Trio link the Rac1 and the RhoA pathways in vivo. *Oncogene* 16, 147–152.
- Bianco, A., Poukkula, M., Cliffe, A., Mathieu, J., Luque, C. M., Fulga, T. a, and Rørth, P. (2007). Two distinct modes of guidance signalling during collective migration of border cells. *Nature* 448, 362–365.
- Billadeau, D. D. (2002). Cell Growth and Metastasis in Pancreatic Cancer. *Interantional Journal of Gastrointestinal Cancer* 31, 5–13.
- Bishop, A. ., and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *The Biochemical journal* 348 Pt 2, 241–255.
- Boguski, M. S., and F. McCormick. (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366:643-654.

- Bos, J. L., Rehmann, H., and Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129, 865–877.
- Bourguignon, L. Y., Zhu, H., Shao, L., and Chen, Y. W. (2000). Ankyrin-Tiam1 interaction promotes Rac1 signaling and metastatic breast tumor cell invasion and migration. *The Journal of cell biology* 150, 177–191.
- Braga, V. M. M. (2002). Cell – cell adhesion and signalling. *Current Opinion in Cell Biology*, 546–556.
- Braga, V. M., Machesky, L. M., Hall, a, and Hotchin, N. a (1997). The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *The Journal of cell biology* 137, 1421–1431.
- Brock, J., Midwinter, K., Lewis, J., and Martin, P. (1996). Demonstration of a Requirement for Rho Activation. *Journal of cell biology* 135, 1097–1107.
- Brower, D. L., Smith, R. J., and Wilcox, M. (1981). Differentiation within the gonads of *Drosophila* revealed by immunofluorescence. *Journal of embryology and experimental morphology* 63, 233–242.
- Brugnera, E., Haney, L., Grimsley, C., Lu, M., Walk, S. F., Tosello-Tramont, A.-C., Macara, I. G., Madhani, H., Fink, G. R., and Ravichandran, K. S. (2002). Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nature cell biology* 4, 574–582.
- Bustelo, X. R. 1996. The VAV family of signal transduction molecules. *Crit. Rev. Oncog.* 7:65–88.
- Bustelo, X. R. (2000). Regulatory and Signaling Properties of the Vav Family. *Molecular and cellular biology* 20.
- Bustelo, X. R. (2001). Vav proteins, adaptors and cell signaling. *Oncogene* 20, 6372–6381.
- Bustelo XR, Ledbetter JA, Barbacid M. Product of vav proto-oncogene defines a new class of tyrosine protein kinase substrates. (1992). *Nature*. 5;356(6364):68-71.
- Campbell, K., Whissell, G., Franch-Marro, X., Batlle, E., and Casanova, J. (2011). Specific GATA factors act as conserved inducers of an endodermal-EMT. *Developmental cell* 21, 1051–1061.
- Cano, a, Pérez-Moreno, M. a, Rodrigo, I., Locascio, a, Blanco, M. J., Del Barrio, M. G., Portillo, F., and Nieto, M. a (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature cell biology* 2, 76–83.
- Chen, L., Hughes, R. a, Baines, A. J., Conboy, J., Mohandas, N., and An, X. (2011). Protein 4.1R regulates cell adhesion, spreading, migration and motility of mouse keratinocytes by modulating surface expression of beta1 integrin. *Journal of cell science* 124, 2478–2487.
- Chishtia, A. H., Kim, A. C., Marfatia, S. M., Lutchman, M., Hanspal, M., Jindal, H., Liu, S.-C., Low, P. S., Rouleau, G. A., Mohandas, N., et al. (1998). The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends in biochemical sciences* 0004, 281–282.
- Cho, N. K., Keyes, L., Johnson, E., Heller, J., Ryner, L., Karim, F., and Krasnow, M. a (2002). Developmental control of blood cell migration by the *Drosophila* VEGF pathway. *Cell* 108, 865–876.

- Chrzanowska-Wodnicka, M., and Burridge, K. (1996). Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *The Journal of cell biology* 133, 1403–1415.
- Citterio C, Menacho-Márquez M, García-Escudero R, Larive RM, Barreiro O, Sánchez-Madrid F, Paramio JM, Bustelo XR. (2012). The rho exchange factors vav2 and vav3 control a lung metastasis-specific transcriptional program in breast cancer cells. *Sci Signal*. Oct 2;5(244):ra71
- Cobrerros, L., Fernández-Miñán, A., Luque, C. M., González-Reyes, A., and Martín-Bermudo, M. D. (2008). A role for the chaperone Hsp70 in the regulation of border cell migration in the *Drosophila* ovary. *Mechanisms of development* 125, 1048–1058.
- Correas, I., Leto, T. L., Speicher, D. W., and Marchesi, V. T. (1986). Identification of the functional site of erythrocyte protein 4.1 involved in spectrin-actin associations. *The Journal of biological chemistry* 261, 3310–3315.
- Couceiro, J. R., Martín-Bermudo, M. D., and Bustelo, X. R. (2005). Phylogenetic conservation of the regulatory and functional properties of the Vav oncoprotein family. *Exp Cell Res* 308, 364–380.
- Cowan, C. W., Shao, Y. R., Sahin, M., Shamah, S. M., Lin, M. Z., Greer, P. L., Gao, S., Griffith, E. C., Brugge, J. S., and Greenberg, M. E. (2005). Vav family GEFs link activated Ephs to endocytosis and axon guidance. *Neuron* 46, 205–217.
- Crespo, P., Schuebel, K. ., Ostrom, A. ., Gutkind, J. ., and Bustelo, X. . (1997). Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product. *Nature* 385, 169–172.
- Decotto, E., and Spradling, A. C. (2005). The *Drosophila* ovarian and testis stem cell niches: similar somatic stem cells and signals. *Developmental cell* 9, 501–510.
- Duchek, P., and Rorth, P. (2001). Guidance of Cell Migration by EGF Receptor Signaling During *Drosophila* Oogenesis. *Science* 291, 131–133.
- Duchek, P., Somogyi, K., Jékely, G., Beccari, S., and Rørth, P. (2001a). Guidance of cell migration by the *Drosophila* PDGF/VEGF receptor. *Cell* 107, 17–26.
- Duchek, P., Somogyi, K., Jékely, G., Beccari, S., and Rørth, P. (2001b). Guidance of cell migration by the *Drosophila* PDGF/VEGF receptor. *Cell* 107, 17–26.
- Easty, D. ., and Easty, G. . (1974). Measurement of the ability of cells to infiltrate normal tissues in vitro.
- Edwards, K. a, Demsky, M., Montague, R. a, Weymouth, N., and Kiehart, D. P. (1997). GFP-moesin illuminates actin cytoskeleton dynamics in living tissue and demonstrates cell shape changes during morphogenesis in *Drosophila*. *Developmental biology* 191, 103–117.
- Fehon, R. G., Dawson, I. a, and Artavanis-Tsakonas, S. (1994). A *Drosophila* homologue of membrane-skeleton protein 4.1 is associated with septate junctions and is encoded by the coracle gene. *Development (Cambridge, England)* 120, 545–557.
- Fernández-Espartero, C. H., Ramel, D., Farago, M., Malartre, M., Luque, C. M., Limanovich, S., Katzav, S., Emery, G., and Martín-Bermudo, M. D. (2013). The GEF Vav regulates guided cell migration by

- coupling guidance receptor signalling to local Rac activation. *Journal of cell science*.
- Fernandez-Zapico, M. E., Gonzalez-Paz, N. C., Weiss, E., Savoy, D. N., Molina, J. R., Fonseca, R., Smyrk, T. C., Chari, S. T., Urrutia, R., and Billadeau, D. D. (2005). Ectopic expression of VAV1 reveals an unexpected role in pancreatic cancer tumorigenesis. *Cancer cell* 7, 39–49.
- Fischer, K. D., Kong, Y. Y., Nishina, H., Tedford, K., Marengère, L. E., Koziaradzki, I., Sasaki, T., Starr, M., Chan, G., Gardener, S., et al. (1998). Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T-cell receptor. *Current biology : CB* 8, 554–562.
- Forsberg-Nilsson, K., Behar, T. N., Afrakhte, M., Barker, J. L., and McKay, R. D. (1998). Platelet-derived growth factor induces chemotaxis of neuroepithelial stem cells. *Journal of neuroscie* 53, 521–530.
- Fox, G. L., Rebay, I., and Hynes, R. O. (1999). Expression of DFak56, a *Drosophila* homolog of vertebrate focal adhesion kinase, supports a role in cell migration in vivo. *PNAS* 96, 14978–14983.
- Freeman, M. (1996). Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the *Drosophila* eye. *Cell* 87, 651–660.
- Friedl, P., Hegerfeldt, Y., and Tusch, M. (2004). Collective cell migration in morphogenesis and cancer. *The International journal of developmental biology* 48, 441–449.
- Fujimoto, M., Poe, J. C., Jansen, P. J., and Tedder, T. F. (2013). CD19 Amplifies B Lymphocyte Signal Transduction by Regulating Src-Family Protein Tyrosine Kinase Activation. *Journal of immunology* 162, 7088–7094.
- Garrett, T. A., Van Buul, J. D., and Burridge, K. (2007). VEGF-induced Rac1 activation in endothelial cells is regulated by the guanine nucleotide exchange factor Vav2. *Experimental cell research* 313, 3285–3297.
- Geisbrecht, E. R., and Montell, D. J. (2004). A role for *Drosophila* IAP1-mediated caspase inhibition in Rac-dependent cell migration. *Cell* 118, 111–125.
- Goode, S., and Perrimon, N. (1997). Inhibition of patterned cell shape change and cell invasion by Discs large during *Drosophila* oogenesis. *Genes & Development* 11, 2532–2544.
- Graham, D. B., Zinselmeyer, B. H., Mascarenhas, F., Delgado, R., Miller, M. J., and Swat, W. (2009). ITAM signaling by Vav family Rho guanine nucleotide exchange factors regulates interstitial transit rates of neutrophils in vivo. *PloS one* 4, e4652.
- Grammont, M., and Irvine, K. D. (2002). Organizer activity of the polar cells during *Drosophila* oogenesis. *Development (Cambridge, England)* 129, 5131–5140.
- Gumbiner, B. M. (2000). Regulation of cadherin adhesive activity. *The Journal of cell biology* 148, 399–404.
- Gumbiner, B. M. (2005). Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6, 622–634.
- Hage, B., Meinel, K., Baum, I., Giehl, K., and Menke, A. (2009). Rac1 activation inhibits E-cadherin-mediated adherens junctions via binding to IQGAP1 in pancreatic carcinoma cells. *Cell communication and signaling: CCS* 7, 23.

- Hajra, K. M., and Fearon, E. R. (2002). Cadherin and catenin alterations in human cancer. *Genes, chromosomes & cancer* 34, 255–268.
- Halbleib, J. M., and Nelson, W. J. (2006). Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes & development* 20, 3199–3214.
- Harti, F.U., 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571–580.
- Heasman, S. J., and Ridley, A. J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9, 690–701.
- Hirano, M., Hashimoto, S., Yonemura, S., Sabe, H. and Aizawa, S. (2008). EPB41L5 functions to post-transcriptionally regulate cadherin and integrin during epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Biol.* 182, 1217–1230.
- Hoch, R. V, and Soriano, P. (2003). Roles of PDGF in animal development. *Development* (130, 4769–4784. Available at:
- Holsinger, L. J., Graef, I. a, Swat, W., Chi, T., Bautista, D. M., Davidson, L., Lewis, R. S., Alt, F. W., and Crabtree, G. R. (1998). Defects in actin-cap formation in Vav-deficient mice implicate an actin requirement for lymphocyte signal transduction. *Current biology: CB* 8, 563–572.
- Hornstein, I., Mortin, M. a, and Katzav, S. (2003). DroVav, the *Drosophila melanogaster* homologue of the mammalian Vav proteins, serves as a signal transducer protein in the Rac and DER pathways. *Oncogene* 22, 6774–6784.
- Innocenti, M., Frittoli, E., Ponzanelli, I., Falck, J. R., Brachmann, S. M., Di Fiore, P. P., and Scita, G. (2003). Phosphoinositide 3-kinase activates Rac by entering in a complex with Eps8, Abi1, and Sos-1. *The Journal of cell biology* 160, 17–23.
- Ip, Y. T., and Gridley, T. (2002). Cell movements during gastrulation: snail dependent and independent pathways. *Current opinion in genetics & development* 12, 423–429.
- Jacinto, A., Woolner, S., and Martin, P. (2002). Dynamic analysis of dorsal closure in *Drosophila*: from genetics to cell biology. *Developmental cell* 3, 9–19.
- Kardash, E., Reichman-fried, M., Maître, J., Boldajipour, B., and Papusheva, E. (2010). A role for Rho GTPases and cell – cell adhesion in single-cell motility in vivo. *12*.
- Katzav, S. (1993). Single point mutations in the SH2 domain impair the transforming potential of vav and fail to activate proto-vav. *Oncogene* 8, 1757–1763.
- Katzav, S., Cleveland, J. L., Heslop, H. E., and Pulido, D. (1991). Loss of the amino-terminal helix-loop-helix domain of the vav proto-oncogene activates its transforming potential. *Molecular and cellular biology* 11, 1912–1920.
- Katzav, S., Martin-Zanca, D., and Barbacid, M. (1989). vav, a novel human oncogene derived from a locus ubiquitously expressed in hematopoietic cells. *EMBO Journal* 8, 2283–2290.
- Kiyokawa, E., Hashimoto, Y., Kobayashi, S., Sugimura, H., Kurata, T., and Matsuda, M. (1998). Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes & Development* 12, 3331–3336.
- Kjoller, L., and Hall, a (1999). Signaling to Rho GTPases. *Experimental cell research* 253, 166–179..

- Kolega, J. (1981). The movement of cell clusters in vitro: morphology and directionality. *Journal of cell science* 49, 15–32.
- Koyasu, S., Nishida, E., Kadowaki, T., Matsuzaki, F., Iida, K., Harada, F., Kasuga, M., Sakai, H., and Yahara, I. (1986). Two mammalian heat shock proteins , HSP90 and HSP100 , are actin-binding proteins. *PNAS* 83, 8054–8058.
- Kozma, R., Sarnier, S., and Ahmed, S. (1997). Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs , Rac1 , and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid . *Rho Family GTPases and Neuronal Growth Cone Remodell.*
- Kraynov, V. S., Chamberlain, C., Bokoch, G. M., Schwartz, M. A., Slabaugh, S. and Hahn, K. M. (2000). Localized Rac activation dynamics visualized in living cells. *Science* 290, 333–337
- Lamarche, N., Tapon, N., Stowers, L., Burbelo, P. D., Aspenström, P., Bridges, T., Chant, J., and Hall, a (1996). Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of p65PAK and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. *Cell* 87, 519–529.
- Laprise, P., Lau, K. M., Harris, K. P., Silva-Gagliardi, N. F., Paul, S. M., Beronja, S., Beitel, G. J., McGlade, C. J., and Tepass, U. (2009). Yurt, Coracle, Neurexin IV and the Na(+),K(+)-ATPase form a novel group of epithelial polarity proteins. *Nature* 459, 1141–1145.
- Lazer, G., Idelchuk, Y., Schapira, V., Pikarsky, E. and Katzav, S. (2009). The 511 512 haematopoietic specific signal transducer Vav1 is aberrantly expressed in lung cancer and 513 plays a role in tumourigenesis. *J Pathol* 219, 25–34.
- Lee, J. D., Silva-Gagliardi, N. F., Tepass, U., McGlade, C. J. and Anderson, K. V. (2007). The FERM protein Epb4.115 is required for organization of the neural plate and for the epithelial-mesenchymal transition at the primitive streak of the mouse embryo. *Development* 134, 2007–2016.
- Leeuwen, F. N., Kain, H. E., Kammen, R. a, Michiels, F., Kranenburg, O. W., and Collard, J. G. (1997). The guanine nucleotide exchange factor Tiam1 affects neuronal morphology; opposing roles for the small GTPases Rac and Rho. *The Journal of cell biology* 139, 797–807.
- Li, J., Sun, X., Wang, Z., Chen, L., Li, D., Zhou, J., and Liu, M. (2012). Regulation of vascular endothelial cell polarization and migration by Hsp70/Hsp90-organizing protein. *PloS one* 7, e36389.
- Lin, H., and Spradling, A. C. (1993). Germline Stem Cell Division and Egg Chamber Development in Transplanted Drosophila Germaria. *Developmental biology* 159, 140–152.
- Lin KT, Gong J, Li CF, Jang TH, Chen WL, Chen HJ, Wang LH. (2012a). Vav3-rac1 signaling regulates prostate cancer metastasis with elevated Vav3 expression correlating with prostate cancer progression and posttreatment recurrence. *Cancer Res.* 15;72(12):3000-9.
- Lin KY, Wang LH, Hseu YC, Fang CL, Yang HL, Kumar KJ, Tai C, Uen YH. (2012b). Clinical significance of increased guanine nucleotide exchange factor Vav3 expression in human gastric cancer. *Mol Cancer Res.* 10(6):750-9.
- Liu, B. P., and Burridge, K. (2000a). Vav2 activates Rac1, Cdc42, and RhoA downstream from growth factor receptors but not beta1 integrins. *Molecular and cellular biology* 20, 7160–7169.

- Liu, B. P., and Burridge, K. (2000b). Vav2 activates Rac1, Cdc42, and RhoA downstream from growth factor receptors but not beta1 integrins. *Molecular and cellular biology* 20, 7160–7169.
- Liu, Y., and Montell, D. J. (1999). Identification of mutations that cause cell migration defects in mosaic clones. *Development (Cambridge, England)* 126, 1869–1878.
- Liu, Y., and Montell, D. J. (2001). Jing: a downstream target of slbo required for developmental control of border cell migration. *Development (Cambridge, England)* 128, 321–330.
- Lu, Y., and Settleman, J. (1999). The Drosophila Pkn protein kinase is a Rho/Rac effector target required for dorsal closure embryogenesis. *Genes & Development* 13, 1168–1180.
- Machacek, M., Hodgson, L., Welch, C., Elliott, H., Pertz, O., Nalbant, P., Abell, A., Johnson, G. L., Hahn, K. M., and Danuser, G. (2009). Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature* 461, 99–103.
- Marchesi, V.T. 1985. Stabilizing infrastructure of cell membranes. *Ann. Rev. Cell Biol.* 1:531–561.
- Machesky, L. M., and Hall, a (1997). Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization. *The Journal of cell biology* 138, 913–926.
- Malartre, M., Ayaz, D., Amador, F. F., and Martín-Bermudo, M. D. (2010). The guanine exchange factor vav controls axon growth and guidance during Drosophila development. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 2257–2267.
- Margolis, B., Hu, P., Katzav, S., Li, W., Oliver, J.M., Ullrich, A., Weiss, A., and Schlessinger, J. (1992). Tyrosine phosphorylation of vav proto-oncogene product containing SH2 domain and transcription factor motifs. *Nature* 356, 71–74.
- Margolis, J., and Spradling, a (1995). Identification and behavior of epithelial stem cells in the Drosophila ovary. *Development (Cambridge, England)* 121, 3797–3807.
- McDonald, J. a, Pinheiro, E. M., Kadlec, L., Schupbach, T., and Montell, D. J. (2006). Multiple EGFR ligands participate in guiding migrating border cells. *Developmental biology* 296, 94–103.
- McDonald, J. a., Pinheiro, E. M., and Montell, D. J. (2003). PVF1, a PDGF/VEGF homolog, is sufficient to guide border cells and interacts genetically with Taiman. *Development* 130, 3469–3478.
- Montell, D. J. (2003). Border-cell migration: the race is on. *Nature reviews. Molecular cell biology* 4, 13–24.
- Montell, D. J., Pernille, R., and Spradling, A. C. (1992). slow border cells , a locus required for a developmentally regulated cell migration during Oogenesis , Encodes drosophila C/EBP. *Cell* 71, 51–62.
- Movilla, N., and Bustelo, X. R. (1999). Biological and regulatory properties of Vav-3, a new member of the Vav family of oncoproteins. *Molecular and cellular biology* 19, 7870–7885.
- Movilla, N., Dosil, M., Zheng, Y., and Bustelo, X. R. (2001). How Vav proteins discriminate the GTPases Rac1 and RhoA from Cdc42. *Oncogene* 20, 8057–8065.
- Murphy, A. M., and Montell, D. J. (1996). Cell Type-specific Roles for Cdc42 , Rac , and RhoL. *The Journal of Cell Biology* 133, 617–630.

- Nakagawa, S., and Takeichi, M. (1995). Neural crest cell-cell adhesion controlled by sequential and subpopulation-specific expression of novel cadherins. *Development* 121, 1321–1332.
- Nalbant, P., Hodgson, L., Kraynov, V., Touthkine, A., and Hahn, K. M. (2004). Activation of endogenous Cdc42 visualized in living cells. *Science* 305, 1615–1619. February 1, 2013].
- Niewiadomska, P., Godt, D., and Tepass, U. (1999). E-Cadherin Is Required for Intercellular Motility during. *Cell* 144, 533–548.
- Nimnual, A. S., Yatsula, B. A., and Sagi-Bar, D. (1998). Coupling of Ras and Rac Guanosine Triphosphatases Through the Ras Exchanger Sos. *Science* 279, 560–563.
- Nimnual, A., and Bar-Sagi, D. (2002). The two hats of SOS. *Sci. STKE* 2002, PE36.
- Nobes, C. D., and Hall, A (1999). Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *The Journal of cell biology* 144, 1235–1244.
- Nobes, C. D., and Hall, A (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53–62.
- Nollet, F., Kools, P., and Van Roy, F. (2000). Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *Journal of molecular biology* 299, 551–572.
- Oda, H., Tsukita, S., and Takeichi, M. (1998). Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during *Drosophila* gastrulation. *Developmental biology* 203, 435–450.
- Palmer, R. H., Fessler, L. I., Edeen, P. T., Madigan, S. J., Mckeown, M., and Hunter, T. (1999). DFak56 Is a Novel *Drosophila melanogaster* Focal Adhesion Kinase *. *The Journal of biological chemistry* 274, 35621–35629.
- Pandey, a, Podtelejnikov, a V, Blagoev, B., Bustelo, X. R., Mann, M., and Lodish, H. F. (2000). Analysis of receptor signaling pathways by mass spectrometry: identification of vav-2 as a substrate of the epidermal and platelet-derived growth factor receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 179–184.
- Peinado, H., Portillo, F., and Cano, A. (2004). Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *The International journal of developmental biology* 48, 365–375.
- Pertz, O., Hodgson, L., Klemke, R. L., and Hahn, K. M. (2006). Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature* 440, 1069–1072.
- Pinheiro, E. M., and Montell, D. J. (2004). Requirement for Par-6 and Bazooka in *Drosophila* border cell migration. *Development* 131, 5243–5251.
- Pirraglia, C., Walters, J., Ahn, N., and Myat, M. M. (2013). Rac1 GTPase acts downstream of α PS1 β PS integrin to control collective migration and lumen size in the *Drosophila* salivary gland. *Developmental biology* 377, 21–32.
- Polesello, C., and Payre, F. (2004). Small is beautiful: what flies tell us about ERM protein function in development. *Trends in cell biology* 14, 294–302.

- Poukkula, M., Cliffe, A., Changede, R., and Rørth, P. (2011). Cell behaviors regulated by guidance cues in collective migration of border cells. *The Journal of cell biology* 192, 513–524.
- Prasad, M., and Montell, D. J. (2007). Cellular and molecular mechanisms of border cell migration analyzed using time-lapse live-cell imaging. *Developmental cell* 12, 997–1005.
- Qiu, X.-B., Shao, Y.-M., Miao, S., and Wang, L. (2006). The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 63, 2560–2570.
- Riddiford, L.M., 1993. Hormones and *Drosophila* development. In: Bate, M., Martínez Arias, A. (Eds.). *The Development of Drosophila melanogaster*, vol. II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 899–940.
- Ridley, a J., and Hall, a (1994). Signal transduction pathways regulating Rho-mediated stress fibre formation: requirement for a tyrosine kinase. *The EMBO journal* 13, 2600–2610.
- Ridley, a J., and Hall, a (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70, 389–399.
- Ridley, A. J. (1995). Rho-related proteins: actin cytoskeleton and cell cycle. *Current opinion in genetics & development* 5, 24–30.
- Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70, 401–410.
- Robinson, D. R., Wu, Y. M., and Lin, S. F. (2000). The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 19, 5548–5557.
- Rossman, K. L., Der, C. J., and Sondek, J. (2005). GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6, 167–180.
- Ruiz-Sáenz, A., Kremer, L., Alonso, M. a, Millán, J., and Correas, I. (2011). Protein 4.1R regulates cell migration and IQGAP1 recruitment to the leading edge. *Journal of cell science* 124, 2529–2538.
- Ruohola, H., Bremer, K. a, Baker, D., Swedlow, J. R., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1991). Role of neurogenic genes in establishment of follicle cell fate and oocyte polarity during oogenesis in *Drosophila*. *Cell* 66, 433–449.
- Saha, B., Chaiwun, B., Imam, S. S., Tsao-Wei, D. D., Groshen, S., Naritoku, W. Y., and Imam, S. A. (2007). Overexpression of E-cadherin protein in metastatic breast cancer cells in bone. *Anticancer research* 27, 3903–3908.
- Sanchez-Aguilera, A., Lee, Y.-J., Lo Celso, C., Ferraro, F., Brumme, K., Mondal, S., Kim, C., Dorrance, A., Luo, H. R., Scadden, D. T., et al. (2011). Guanine nucleotide exchange factor Vav1 regulates perivascular homing and bone marrow retention of hematopoietic stem and progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 9607–9612.
- Sander, E. E., Ten Klooster, J. P., Van Delft, S., Van der Kammen, R. a, and Collard, J. G. (1999). Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *The Journal of cell biology* 147, 1009–1022.
- Sarmiento, C., Wang, W., Dovas, A., Yamaguchi, H., Sidani, M., El-Sibai, M., Desmarais, V., Holman, H. a, Kitchen, S., Backer, J. M.,

- et al. (2008). WASP family members and formin proteins coordinate regulation of cell protrusions in carcinoma cells. *The Journal of cell biology* 180, 1245–1260.
- Schmidt, A., and Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes & Development*, 1587–1609.
- Schuebel, K. E., Movilla, N., Rosa, J. L., and Bustelo, X. R. (1998). Phosphorylation-dependent and constitutive activation of Rho proteins by wild-type and oncogenic Vav-2. *The EMBO journal* 17, 6608–6621.
- Schumacher, S., Gryzik, T., Tannebaum, S., and Müller, H.-A. J. (2004). The RhoGEF Pebble is required for cell shape changes during cell migration triggered by the Drosophila FGF receptor Heartless. *Development* 131, 2631–2640.
- Schymeinsky, J., Sindrilaru, A., Frommhold, D., Sperandio, M., Gerstl, R., Then, C., Mócsai, A., Scharffetter-Kochanek, K., and Walzog, B. (2006). The Vav binding site of the non-receptor tyrosine kinase Syk at Tyr 348 is critical for beta2 integrin (CD11/CD18)-mediated neutrophil migration. *Blood* 108, 3919–3927.
- Shapiro, L., and Weis, W. I. (2009). Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1, a003053.
- Siegers, K., Bölter, B., Schwarz, J. P., Böttcher, U. M. K., Guha, S., and Hartl, F. U. (2003). TRiC/CCT cooperates with different upstream chaperones in the folding of distinct protein classes. *The EMBO journal* 22, 5230–5240.
- Silver, D. L., and Montell, D. J. (2001). Paracrine signaling through the JAK/STAT pathway activates invasive behavior of ovarian epithelial cells in Drosophila. *Cell* 107, 831–841.
- Simpson, P. B., and Armstrong, R. C. (1999). Intracellular signals and cytoskeletal elements involved in oligodendrocyte progenitor migration. *Glia* 26, 22–35.
- Spurrell, D. R., Luckashenak, N. a, Minney, D. C., Chaplin, A., Penninger, J. M., Liwski, R. S., Clements, J. L., and West, K. a (2009). Vav1 regulates the migration and adhesion of dendritic cells. *Journal of immunology* 183, 310–318.
- Stramer, B., Moreira, S., Millard, T., Evans, I., Huang, C. Y., Sabet, O., Milner, M., Dunn, G., Martin, P., and Wood, W. (2010). Clasp-mediated microtubule bundling regulates persistent motility and contact repulsion in. *Journal of cell biology* 189, 681–689.
- Szafrański, P., and Goode, S. (2004). A Fasciclin 2 morphogenetic switch organizes epithelial cell cluster polarity and motility. *Development (Cambridge, England)* 131, 2023–2036.
- Takaishi, K., Sasaki, T., Kotani, H., Nishioka, H., and Takai, Y. (1997). Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells. *The Journal of cell biology* 139, 1047–1059.
- Takeichi, M. (1990). Cadherins: A molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 237– 252.
- Tamás, P., Solti, Z., Bauer, P., Illés, A., Sipeki, S., Bauer, A., Faragó, A., Downward, J., and Buday, L. (2003). Mechanism of epidermal growth factor regulation of Vav2, a guanine nucleotide exchange factor for Rac. *The Journal of biological chemistry* 278, 5163–5171.
- Tang, a, Eller, M. S., Hara, M., Yaar, M., Hirohashi, S., and Gilchrist, B. a (1994). E-cadherin is the major mediator of human melanocyte

- adhesion to keratinocytes in vitro. *Journal of cell science* 107 (Pt 4, 983–992.
- Tepass, U., Truong, K., Godt, D., Ikura, M., and Peifer, M. (2000). Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 1, 1–10.
- Theodosiou, N. A, and Xu, T. (1998). Use of FLP/FRT system to study *Drosophila* development. *Methods (San Diego, Calif.)* 14, 355–365.
- Theveneau, E., and Mayor, R. (2012). Cadherins in collective cell migration of mesenchymal cells. *Current Opinion in Cell Biology* 24, 677–684.
- Toumaniantz, G., Ferland-McCollough, D., Cario-Toumaniantz, C., Pacaud, P., and Loirand, G. (2010). The Rho protein exchange factor Vav3 regulates vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Cardiovascular research* 86, 131–140.
- Turner, M., and Billadeau, D. D. (2002). VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors. *Nature reviews. Immunology* 2, 476–486.
- Vanni, C., Parodi, A., Mancini, P., Visco, V., Ottaviano, C., Torrisi, M. R., and Eva, A. (2004). Phosphorylation-independent membrane relocalization of ezrin following association with Dbl in vivo. *Oncogene* 23, 4098–4106.
- Vedham, V., Phee, H., and Coggeshall, K. M. (2005). Vav Activation and Function as a Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor in Macrophage Colony-Stimulating Factor-Induced Macrophage Chemotaxis. 25, 4211–4220.
- Verheyen, E. M., and Cooley, L. (1994). Profilin mutations disrupt multiple actin-dependent processes during *Drosophila* development. *Development* 120, 717–728.
- Verkhusha, V. V, Tsukita, S., and Oda, H. (1999). Actin dynamics in lamellipodia of migrating border cells in the *Drosophila* ovary revealed by a GFP-actin fusion protein. *FEBS letters* 445, 395–401.
- Vicente-Manzanares, M., Cruz-Adalia, A., Martín-Cófreces, N. B., Cabrero, J. R., Dosil, M., Alvarado-Sánchez, B., Bustelo, X. R., and Sánchez-Madrid, F. (2005). Control of lymphocyte shape and the chemotactic response by the GTP exchange factor Vav. *Blood* 105, 3026–3034.
- Wahlström, G., Norokorpi, H.-L., and Heino, T. I. (2006). *Drosophila* alpha-actinin in ovarian follicle cells is regulated by EGFR and Dpp signalling and required for cytoskeletal remodelling. *Mechanisms of development* 123, 801–818.
- Wang, D., Zhang, L., Zhao, G., Wahlström, G., Heino, T. I., Chen, J., and Zhang, Y. Q. (2010a). *Drosophila* twinfilin is required for cell migration and synaptic endocytosis. *Journal of cell science* 123, 1546–1556.
- Wang, X., He, L., Wu, Y. I., Hahn, K. M., and Montell, D. J. (2010b). Light-mediated activation reveals a key role for Rac in collective guidance of cell movement in vivo. *Nature cell biology* 12, 591–597.
- Wang, X., He, L., Wu, Y. I., Hahn, K. M., and Montell, D. J. (2010c). Light-mediated activation reveals a key role for Rac in collective guidance of cell movement in vivo. *Nature cell biology* 12, 591–597.
- Ward, R. E., Schweizer, L., Lamb, R. S., and Fehon, R. G. (2001). The Protein 4.1, Ezrin, Radixin, Moesin (FERM) Domain of *Drosophila* Coracle, a Cytoplasmic Component of the Septate Junction,

- Provides Functions Essential for Embryonic Development and Imaginal Cell Proliferation. *Molecular Biology*.
- Watanabe, T., Wang, S., Noritake, J., Sato, K., Fukata, M., Takefuji, M., Nakagawa, M., Izumi, N., Akiyama, T., and Kaibuchi, K. (2004). Interaction with IQGAP1 links APC to Rac1, Cdc42, and actin filaments during cell polarization and migration. *Developmental cell* 7, 871–883.
- Wilsbacher, J. L., Moores, S. L., and Brugge, J. S. (2006). An active form of Vav1 induces migration of mammary epithelial cells by stimulating secretion of an epidermal growth factor receptor ligand. *Cell communication and signaling: CCS* 4, 5.
- Woods, D. F., Hough, C., Peel, D., Callaini, G., and Bryant, P. J. (1996). Dig Protein Is Required for Junction Structure, Cell Polarity, and Proliferation Control in. *The Journal of cell biology* 134, 1469–1482.
- Woods, D. F., Wu, J. W., and Bryant, P. J. (1997). Localization of proteins to the apico-lateral junctions of *Drosophila* epithelia. *Developmental genetics* 20, 111–118.
- Yagi, T., and Takeichi, M. (2000). Cadherin superfamily genes: functions , genomic organization , and neurologic. *Genes & Development*, 1169–1180.
- Yang, S., Guo, X., Debnath, G., Mohandas, N., and An, X. (2009). Protein 4.1R links E-cadherin/beta-catenin complex to the cytoskeleton through its direct interaction with beta-catenin and modulates adherens junction integrity. *Biochimica et biophysica acta* 1788, 1458–1465.
- Zohn, I. E., Li, Y., Skolnik, E. Y., Anderson, K. V., Han, J. and Niswander, L. (2006). p38 and a p38-interacting protein are critical for downregulation of E- cadherin during mouse gastrulation. *Cell* 125, 957-969.